

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 536**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2008 E 08807180 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2167541**

54 Título: **El antígeno ED-A de fibronectina está asociado con la neovascularización de la metástasis tumoral**

30 Prioridad:

25.07.2007 US 951765 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2013

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)

LA LIZZA 7

53100 SIENA, IT

72 Inventor/es:

NERI, DARIO;

VILLA, ALESSANDRA;

TRACHSEL, EVELINE y

RYBAK, JASCHA-NIKOLAI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 536 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

El antígeno ED-A de fibronectina está asociado con la neovascularización de la metástasis tumoral

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la detección y al tratamiento del cáncer de pulmón. La invención implica el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, en especial un anticuerpo que se une al dominio ED-A de fibronectina.

10 **[0002]** La angiogénesis describe el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes y es un suceso raro en el adulto pero es un aspecto característico de muchas enfermedades, incluyendo el crecimiento de tumores sólidos. La angiogénesis es necesaria para que los tumores crezcan más de algunos milímetros de diámetro y los tumores pueden inducir la angiogénesis a través de la secreción de diferentes factores de crecimiento, p. ej., el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los nuevos vasos sanguíneos formados como resultado de la angiogénesis se denominan la neovascularización del tumor, y una neovascularización vigorosa es un aspecto característico de un tumor agresivo.

15 **[0003]** La fibronectina (FN) es una glicoproteína que es expresada ampliamente en una variedad de tejidos normales y en fluidos corporales. Es un componente de la matriz extracelular (ECM), y tiene una función en muchos procesos biológicos, incluyendo la adhesión celular, migración celular, hemostasia, trombosis, curación de heridas, diferenciación tisular y transformación oncogénica.

20 **[0004]** Se generan diferentes isoformas de FN por corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIIICS) del transcrito primario de la FN, pre-ARNm, un proceso que es modulado por citoquinas y el pH extracelular (Balza 1988; Carnemolla 1989; Borsi 1990; Borsi 1995). La fibronectina contiene dos extradominios globulares de tipo III que pueden experimentar corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar y col. 2006). Los ED-A de fibronectina de ratón y la fibronectina humana son idénticos en un 96,7 % (solo difieren en 3 aminoácidos entre las dos secuencias de 90 aminoácidos, véase la figura 2).

25 **[0005]** La expresión del ED-A de fibronectina se ha descrito en células tumorales y en tumores sólidos a nivel del ARNm en el cáncer de mama (Jacobs y col. 2002, Matsumoto y col. 1999) y cáncer hepático (Oyama y col. 1989, Tavian y col. 1994) y a nivel de proteína aislada en el fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y melanoma (Borsi y col. 1987).

30 **[0006]** A nivel inmunohistoquímico, la presencia de ED-A se ha detectado en la matriz extracelular (ECM) de tumores odotogénicos (Heikinheimo y col. 1991) y carcinoma hepatocelular (Koukoulis y col. 1995). En cambio, se ha detectado ED-A en el estroma de neoplasias malignas de mama (Koukoulis y col. 1993), y en los vasos sanguíneos y membranas basales de carcinoma de células renales bien diferenciado (Lohi y col. 1995). Sin embargo, en el carcinoma de células renales menos diferenciado (Lohi y col. 1995) y carcinoma papilar de tiroides (Scarpino y col. 1999) el ED-A se ha detectado en vasos sanguíneos, membranas basales y estroma tumoral. También se ha descrito la presencia de ED-A en la vasculatura de gliomas (Borsi y col. 1998). Por lo tanto, el patrón de expresión del ED-A descrito para los diferentes tipos de tumores es muy variable.

35 **[0007]** Los autores de la invención muestran en el presente documento que el ED-A es expresado selectivamente en la neovascularización de tumores pulmonares, incluyendo tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Puesto que los vasos sanguíneos tumorales son fácilmente accesibles para los agentes terapéuticos administrados por vía intravenosa (Neri y Bicknell 2005, Rybak y col. 2006, Thorpe 2004, Trachsel y Neri 2006), las moléculas de unión tales como moléculas de anticuerpo que se unen a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina representan nuevos agentes que se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas y 40 cáncer de pulmón de células no pequeñas.

[0008] Se ha sugerido previamente el procedimiento basado en anticuerpos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón (documento WO2004/094612).

55 **[0009]** La terapia de la neovascularización tumoral (dirigirse a la vasculatura tumoral) es un procedimiento prometedor para el tratamiento de tumores. El dirigirse a la vasculatura tumoral tiene como objetivo alterar la vasculatura dentro del propio tumor, reduciendo el flujo sanguíneo para privar al tumor de oxígeno y nutrientes, produciendo la muerte de las células tumorales.

60 **[0010]** En el presente documento se describen anticuerpos dirigidos contra ED-A que reconocen selectivamente los vasos sanguíneos de nueva formación de los tumores pulmonares, incluyendo tumores de pulmón de células pequeñas y tumores de pulmón de células no pequeñas.

[0011] La presente invención es como se expone en las reivindicaciones.

[0012] La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma extradominio-A (ED-A) de la fibronectina, para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer de pulmón, en el que el miembro de unión se conjuga con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica, o a un radioisótopo.

5 **[0013]** La invención también proporciona el uso de un anticuerpo que se une a la isoforma de ED-A, o ED-A de fibronectina conjugado con una molécula, para la preparación de un medicamento para suministrar en un tumor pulmonar, p. ej., a la neovascularización de un tumor pulmonar, la molécula conjugada con el anticuerpo, en el que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica, o es un radioisótopo.

10 **[0014]** La invención proporciona un anticuerpo que se une a la isoforma de ED-A, o ED-A de fibronectina, para su uso en un procedimiento in vivo de diagnóstico de cáncer de pulmón en un ser humano o animal.

[0015] La invención también proporciona un procedimiento in vitro para el diagnóstico del cáncer de pulmón, en el que se usa un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina.

15 **[0016]** La invención proporciona el uso de un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, para fabricar un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico del cáncer de pulmón. La invención también proporciona el uso de un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina, para fabricar un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico del
20 cáncer de pulmón.

[0017] La invención también proporciona un anticuerpo para su uso como se ha expuesto antes, en el que el procedimiento in vivo de diagnóstico de cáncer de pulmón en un ser humano o animal comprende las etapas de:

25 (a) administrar al ser humano o al animal una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina, y

(b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión en el pulmón del cuerpo humano o animal;

en el que la localización del miembro de unión en el pulmón indica la presencia de cáncer de pulmón.

30 **[0018]** Además, se describe un procedimiento para tratar el cáncer de pulmón en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina. La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar el cáncer de pulmón en un individuo que comprende administrar al
35 individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina.

[0019] Se describe además un procedimiento para suministrar una molécula a la neovascularización de un tumor pulmonar en un ser humano o animal, que comprende administrar al ser humano o al animal un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, en el que el miembro de unión
40 está conjugado con la molécula. También se describe un procedimiento de suministro de una molécula a la neovascularización de un tumor pulmonar en un ser humano o animal, que comprende administrar al ser humano o al animal un miembro de unión, p. ej., una molécula de anticuerpo, que se une al ED-A de fibronectina, en el que el
45 miembro de unión está conjugado con la molécula.

[0020] Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina, que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina, que comprende una o
50 más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo B2, C5, D5, C8, F8, B7 o G9. Lo más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo F8.

55 **[0021]** Un anticuerpo para su uso en la invención también puede comprender una molécula de anticuerpo, p. ej., una molécula de anticuerpo humano. El miembro de unión normalmente comprende un dominio VH y VL de anticuerpo. También se proporcionan dominios VH de anticuerpo para su uso en la invención. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") y las regiones armazón ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una
60 molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 del VH y una región armazón. Puede comprender alternatively o además un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 del VL y una región armazón. En la presente memoria se describen los dominios VH y VL y las CDR de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9. Todas las secuencias de VH y VL, secuencias de CDR, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y conjuntos de LCDR descritos en la

presente memoria, representan realizaciones de un miembro de unión para su uso en la invención. Como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende las CDR1, CDR2 y CDR3. Por lo tanto, un conjunto de HCDR se refiere a las HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a las LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Salvo que se indique lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.

[0022] Un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de la complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región armazón, en el que la HCDR1 es la SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 ó 113, y en el que la HCDR2 es la SEQ ID NO: 4 y/o la HCDR3 es la SEQ ID NO: 5, como se expone en las reivindicaciones. Preferiblemente, la HCDR1 es la SEQ ID NO: 23, 33, 43, 53, 73, 83 ó 103. Lo más preferiblemente, la HCDR1 es la SEQ ID NO: 83.

[0023] Típicamente, un dominio VH está emparejado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, aunque como se discute más adelante, se puede usar un dominio VH o VL solo para la unión del antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo para su uso en la invención puede comprender además un dominio VL de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de la complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región armazón, en el que la LCDR1 es la SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 ó 116 y en el que la LCDR2 es la SEQ ID NO: 7 y la LCDR3 es la SEQ ID NO: 8, como se expone en las reivindicaciones. Preferiblemente, la LCDR1 es la SEQ ID NO: 26, 36, 46, 56, 76, 86 ó 106. Lo más preferiblemente, la LCDR1 es la SEQ ID NO: 86.

[0024] Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada para el ED-A de fibronectina, que comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH comprende una región armazón y un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y en el que el dominio VL comprende las regiones determinantes de la complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región armazón, y en el que

la HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 ó 113,
la HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4,
la HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5,
la LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 ó 116;
la LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; y
la LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, como se expone en las reivindicaciones.

[0025] Se pueden injertar una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo en una región armazón (p. ej., región armazón humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones armazón pueden comprender secuencias de segmentos de genes de línea germinal humana. Por lo tanto, la región armazón puede ser de línea germinal, de modo que uno o más restos dentro de la región armazón se cambian para que se correspondan con los restos en las posiciones equivalentes en la región armazón de la línea germinal humana más similar. Un anticuerpo para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en una región armazón de línea germinal humana, p. ej. DP47. Normalmente, el anticuerpo también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, p. ej., en una región armazón de la línea germinal humana. La región armazón de la línea germinal humana del VL puede ser DPK22.

[0026] Un dominio VH puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 ó 111. Preferiblemente, un dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21, 31, 41, 51, 71, 81 ó 101. Lo más preferiblemente, un dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81. Un dominio VL puede tener la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 ó 112. Preferiblemente, un dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 32, 42, 52, 72, 82 ó 102. Lo más preferiblemente, un dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82.

[0027] Un anticuerpo para su uso en la invención puede tener un Fv de una cadena (scFv), que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos por un conector peptídico. El experto en la materia puede seleccionar una longitud y secuencia adecuadas del conector, p. ej., al menos de 5 ó 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, 20 ó 25 aminoácidos de longitud. El conector puede tener la secuencia de aminoácidos GSSGG (SEQ ID NO: 28). El scFv puede consistir o comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

[0028] Las moléculas de anticuerpo se describen con más detalle en otra parte en el presente documento.

[0029] Un anticuerpo para su uso en la invención puede estar conjugado con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica. Alternativamente, un anticuerpo para su uso en la invención puede estar conjugado con un radioisótopo. Como una alternativa adicional, un anticuerpo para su uso en la invención puede estar marcado con un marcador detectable.

[0030] Estos y otros aspectos de la invención se describen a continuación con más detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031]

Figura 1: Muestra la tinción inmunohistoquímica de secciones de tumor pulmonar primario con el anticuerpo scFv dirigido contra ED-A D5. La columna 1 indica la clasificación del cáncer de pulmón: A: cáncer de pulmón de células pequeñas, B: cáncer de pulmón de células no pequeñas, C: carcinoma de células escamosas, D: adenocarcinoma, E: carcinoma bronquioalveolar y F: carcinoma de células grandes. Columnas 2 y 3: muestran la detección inmunohistoquímica del ED-A en secciones de tejidos de tumores pulmonares de diferentes subtipos. Las secciones de tejidos mostradas en las columnas 2 y 3 para cada subtipo, se obtuvieron de la misma muestra tumoral. La tinción inmunohistoquímica (líneas más oscuras) puso de manifiesto un patrón vascular intenso de tinción en secciones de tumor primario tanto de A: cáncer de pulmón de células pequeñas, como de B: cáncer de pulmón de células no pequeñas (C: carcinoma de células escamosas, D: adenocarcinoma, E: carcinoma bronquioalveolar y F: carcinoma de células grandes).

Figura 2: muestra un alineamiento entre A: ED-A humano (secuencia superior) y B: ED-A de ratón (secuencia inferior). Los asteriscos indican las posiciones de los aminoácidos en las que los aminoácidos del ED-A humano y el ED-A de ratón son idénticos.

Figura 3A: muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 12). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada. B: muestra la secuencia de nucleótidos de la secuencia conectora del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 14). C: muestra la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 13). La secuencia de nucleótidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 está subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de nucleótidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en negrita y subrayada.

Figura 4A: muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 3) está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 4) se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 5) se muestra en negrita y subrayada. B: muestra la secuencia de aminoácidos de la secuencia conectora del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 11). C: muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 6) está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 7) se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 (SEQ ID NO: 8) se muestra en negrita y subrayada.

TERMINOLOGÍA

Fibronectina

[0032] La fibronectina es un antígeno sujeto a corte y empalme alternativo, y se conocen una serie de isoformas alternativas de la fibronectina, como se describe en otra parte en el presente documento. El extradominio-A (EDA o ED-A) se conoce también como ED, extra-repetición A de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano se ha publicado en Kornblihtt y col. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853 – 5868 y Paoletta y col. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545 – 3557. La secuencia del ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631 – 1720 (Fibronectina tipo-III 12; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721 – 1810 (Fibronectina tipo-III 13; extradominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de acceso P11276.

[0033] La isoforma ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el extradominio A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana se puede deducir a partir de la correspondiente secuencia del precursor de fibronectina humana, que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de acceso P02751. La secuencia de la A-FN de ratón se puede deducir a partir de la correspondiente secuencia del precursor de fibronectina de ratón, que está disponible en

la base de datos SwissProt con el número de acceso P11276. La A-FN puede ser la isoforma ED-A humana de la fibronectina. El ED-A puede ser el extradominio A de la fibronectina humana.

[0034] El ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) por corte y empalme alternativo y está localizado entre el dominio 11 y 12 de la FN (Borsi y col., 1987, *J. Cell Biol.*, 104, 595 – 600). El ED-A está principalmente ausente en la forma plasmática de la FN pero es abundante durante la embriogénesis, remodelación tisular, fibrosis, trasplante cardíaco y crecimiento de tumor sólido.

Corte y empalme alternativo

[0035] El corte y empalme alternativo se refiere a que se producen diferentes patrones de corte y empalme de un transcrito de ARN primario de ADN para producir diferentes ARNm. Después de escisión de intrones, la selección puede determinar qué exones se empalman entre sí para formar un ARNm. El corte y empalme alternativo conduce a la producción de diferentes isoformas que contienen diferentes exones y/o diferente número de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional que corresponde a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

Cáncer de pulmón

[0036] Esto describe una transformación y expansión maligna de tejido pulmonar. Los cánceres de pulmón se pueden agrupar en dos categorías principales: cánceres de pulmón de células pequeñas (carcinoma de células pequeñas) y cánceres de pulmón de células no pequeñas. Los subtipos de cánceres de pulmón de células no pequeñas son carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes. El carcinoma bronquioalveolar es un subtipo de adenocarcinoma. El cáncer de pulmón como se usa en el presente documento puede ser cáncer de pulmón primario. Un tumor pulmonar es un tumor en el pulmón de un animal (p. ej., un ser humano), que es el resultado del cáncer de pulmón. Un tumor pulmonar como se usa en el presente documento puede ser un tumor pulmonar primario.

Tumor primario

[0037] Esto describe un tumor en el sitio en el que el tumor aparece por primera vez (el sitio primario). Los tumores primarios a veces se extienden desde su sitio original (el sitio primario) para formar tumores secundarios (metástasis) en otros sitios en el cuerpo animal y esta expansión se denomina metástasis.

Miembro de unión

[0038] Esto describe un miembro de una pareja de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de una pareja de unión se pueden obtener de forma natural o se pueden producir total o parcialmente de forma sintética. Un miembro de la pareja de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une, y por lo tanto es complementaria, a una organización polar y espacial particular del otro miembro de la pareja de moléculas. Los ejemplos de tipos de parejas de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor hormonal, receptor-ligando, enzima sustrato. La presente invención se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

[0039] Un miembro de unión normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína que no es anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno.

[0040] Un sitio de unión al antígeno se puede proporcionar mediante la disposición de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sobre estructuras proteínicas que no son anticuerpo tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), o mediante aleatorización o mutación de restos de aminoácidos de un bucle en una estructura de proteína para conferir especificidad de unión para una diana deseada. Las estructuras para diseñar nuevos sitios de unión en proteínas han sido revisadas en detalle por Nygren y col. (1997). Se describen estructuras de proteínas para imitar anticuerpos en el documento WO/0034784, en el que los autores de la invención describen proteínas (imitadores de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Una estructura adecuada en la que injertar una o más CDR, p. ej. un conjunto de HCDR, se puede proporcionar mediante cualquier miembro de dominios de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. La estructura puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de una estructura de proteínas que no es anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula estructura que es más pequeña y/o más fácil de producir que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles tales como la capacidad para entrar en células, penetrar profundo en los tejidos o llegar a dianas dentro de otras estructuras, o unirse dentro de cavidades de proteínas del antígeno diana. El uso de sitios de unión al antígeno en estructuras de proteína que no son anticuerpos es revisado por Wess, 2004. Típicamente son proteínas que tienen una estructura principal estable y uno o más bucles variables, en las que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles se muta específica

o aleatoriamente para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno diana. Dichas proteínas incluyen dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (p. ej., 10º dominio de tipo III de fibronectina) y lipocalinas. Otros procedimientos incluyen "microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH) que se basan en ciclótidos, pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares.

[0041] Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo que forman un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión pueden llevar un marcador detectable, o se pueden conjugar con una toxina o un resto que dirige o enzima (p. ej., mediante un enlace o conector peptídico). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (p. ej., en un dominio de enzima) así como un sitio de unión al antígeno, en que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y así dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo por escisión.

[0042] Aunque, como se ha indicado, las CDR las pueden llevar estructuras que no son anticuerpos, la estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR en general será una secuencia de la cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma, en la que la CDR o conjunto de CDR está situada en una localización correspondiente a la CDR o conjunto de CDR de los dominios variables naturales VH y VL del anticuerpo codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a Kabat 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en internet (en immuno.bme.nwu.edu o encontrar "Kabat" usando cualquier motor de búsqueda).

[0043] Por región CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina como definen Kabat y col. (1987), (Kabat 1991a, y ediciones posteriores). Un anticuerpo típicamente contiene 3 CDR de cadenas pesadas y 3 CDR de cadenas ligeras. El término la CDR o las CDR se usa en el presente documento para indicar, según el caso, una de esas regiones o varias, o incluso todas esas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo al antígeno o el epítipo que reconoce.

[0044] Entre las 6 secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad debido esencialmente a los mecanismos de disposición de los genes a los que dan lugar). Puede ser tan corta como de 2 aminoácidos, pero el tamaño mayor conocido es de 26. Funcionalmente, la HCDR3 tiene una función en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat y col., 1991b).

Molécula de anticuerpo

[0045] Esto describe una inmunoglobulina sea natural o producida parcial o totalmente de forma sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Debe entenderse aquí, que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir no están en su entorno natural sino que pueden haberse aislado u obtenido por purificación de fuentes naturales, u obtenido por recombinación genética, o por síntesis química, y que por lo tanto, pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno del anticuerpo incluyen, pero sin limitar, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y fragmentos bivalentes.

[0046] Se pueden tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Dichas técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo, en las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones armazón, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EPA-239400, y un extenso conjunto de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo, se puede someter a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

[0047] Puesto que los anticuerpos se pueden modificar en una serie de formas, la expresión "molécula de anticuerpo" debe considerarse que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión al antígeno del anticuerpo con la especificidad requerida y/o que se une al antígeno. Por lo tanto, esta expresión cubre fragmentos y derivados de anticuerpo, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, están incluidas las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, o equivalente, fusionado con otro polipéptido (p. ej., derivado de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un extenso conjunto de bibliografía posterior.

[0048] Otras técnicas disponibles en la materia de diseño de anticuerpos han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas humanos como describen Kontermann y Dubel (2001). La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones, tales como el documento WO92/01047 (discutido con más detalle a continuación) y las patentes de EE.UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann y Dubel (2001). Los ratones transgénicos, en los que se inactivan los genes de anticuerpos del ratón y se sustituyen funcionalmente por genes de anticuerpos humanos, mientras que se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos (Mendez 1997).

[0049] Se pueden crear moléculas de anticuerpo sintéticas por expresión de genes generados mediante oligonucleótidos sintetizados y ensamblados con vectores de expresión adecuados, por ejemplo como describen Knappik y col. (2000) o Krebs y col. (2001).

[0050] Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo entero pueden realizar la función de unión de antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), que consiste en un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de una cadena (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird 1988; Huston 1988); (viii) dímeros de Fv de una cadena biespecíficos (documento WO93/11161), y (ix) "fragmentos bivalentes", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión de genes (documento WO94/13804; Holliger 1993a). Los Fv, scFv o moléculas de fragmentos bivalentes se pueden estabilizar por incorporación de enlaces disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter 1996). También se pueden hacer minicuerpos que comprenden scFv unido a un dominio CH3 (Hu 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre.

[0051] Los fragmentos de anticuerpo para su uso en la invención se pueden obtener partiendo de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo moléculas de anticuerpo que comprenden dominios VH y/o VL o CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, por procedimientos tales como digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína y/o por escisión de enlaces disulfuro por reducción química. De otra forma, los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener por técnicas de recombinación genética igualmente conocidas por el experto en la materia, o por síntesis de péptidos, por ejemplo, mediante sintetizadores de péptidos automáticos, tales como los suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc., o por síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

[0052] Los fragmentos de anticuerpo funcionales incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida aumente por modificación química, en especial por PEGilación, o por incorporación en un liposoma.

[0053] Un dAb (dominio de anticuerpo) es un fragmento de unión al antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, en concreto la región variable de la cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt 2003). Los dAb de VH se producen de forma natural en los camélidos (p. ej., camello, llama) y se pueden producir por inmunización de un camélido con un antígeno diana, aislamiento de linfocitos B específicos del antígeno y clonación directa de los genes de dAb de linfocitos B individuales. Los dAb también se pueden producir en cultivos celulares. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad térmica los hacen particularmente útiles fisiológicamente y adecuados para la selección y la maduración de afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se expone en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se expone en el presente documento.

[0054] Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente como se expone" se refiere a que la o las características de las CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en el presente documento, serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas cuyas secuencias se exponen en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la frase "muy similar" con respecto a la o las regiones especificadas de uno o más dominios variables, contempla que se pueden hacer de 1 a aproximadamente 5, p. ej. de 1 a 4, incluyendo de 1 a 3, o 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o el dominio VH o VL.

[0055] Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula (Holliger 1999). Su uso se ha demostrado tanto en el campo del diagnóstico como en el campo de la terapia, por su capacidad para reunir nuevas funciones efectoras o dirigirse a varias moléculas sobre la superficie de células tumorales. Cuando se

van a usar anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden producir en una variedad de formas (Holliger 1993b), por ejemplo se pueden preparar por procedimientos químicos o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico mencionados antes. Estos anticuerpos se pueden obtener por procedimientos químicos (Glennie 1987; Repp 1995) o procedimientos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986), pero igualmente por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y así facilitar el procedimiento de purificación del anticuerpo buscado (Merchand 1998). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™ en la que se pueden usar los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y unirlos directamente mediante péptidos cortos flexibles. Estos combina dos anticuerpos en una sola cadena de polipéptido corta. Los fragmentos bivalentes y scFv se pueden construir sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica.

[0056] Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como una IgG entera, como Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como fragmentos bivalentes o como scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos se pueden unir usando procedimientos rutinarios conocidos en la materia para formar anticuerpos tetravalentes.

[0057] Los fragmentos bivalentes biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque se pueden construir fácilmente y expresar en E. coli. Los fragmentos bivalentes (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión adecuadas, se pueden seleccionar fácilmente usando presentación en fagos (documento WO94/13804) de bibliotecas. Si se va a mantener constante un brazo del fragmento bivalente, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra un antígeno diana, entonces se puede hacer una biblioteca en la que el otro brazo varía y seleccionar un anticuerpo de especificidad adecuada.

[0058] Los anticuerpos enteros biespecíficos se pueden hacer por procedimientos de ingeniería alternativos como describen Ridgeway, 1996.

[0059] Están disponibles varios procedimientos en la técnica para obtener anticuerpos dirigidos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que se pueden obtener de acuerdo con procedimientos estándar bien conocidas por el experto en la materia.

[0060] En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, en especial de origen murino, se puede hacer referencia a técnicas que están descritas en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein, 1975.

[0061] Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, de una célula animal inmunizada contra la A-FN, o uno o más de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo un fragmento que comprende o consiste en el ED-A, o un fragmento de péptido de ED-A. La A-FN, o uno de sus fragmentos, se puede producir en especial de acuerdo con los procedimientos de trabajo habituales, por recombinación genética partiendo de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica la A-FN o fragmento de la misma, por síntesis de péptidos partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica de la A-FN y/o fragmento de la misma.

[0062] Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar, por ejemplo, en una columna de afinidad en la que se ha inmovilizado previamente la A-FN o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo un fragmento que comprende o que consiste en ED-A o un fragmento peptídico del ED-A. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguido o no de cromatografía de intercambio iónico dirigida a eliminar los contaminantes proteínicos residuales así como el ADN y los LPS, en sí mismo, seguido o no de cromatografía de exclusión en gel de Sepharose con el fin de eliminar los potenciales agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. Todas estas técnicas se pueden usar simultánea o sucesivamente.

Sitio de unión al antígeno

[0063] Esto describe la parte de una molécula que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión al antígeno del anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse solo a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina un epítipo. Un sitio de unión al antígeno del anticuerpo lo pueden proporcionar uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión al antígeno del anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

Aislado

[0064] Esto se refiere al estado en el que en general estarán los anticuerpos y los miembros de unión descritos en el presente documento, y los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y miembros de unión. Por lo tanto, los miembros de unión, dominios VH y/o VL se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o en el caso del ácido nucleico, exento o sustancialmente exento de ácido nucleico o genes de origen distinto del de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estarán exentos o sustancialmente exentos del material con el que están asociados de forma natural, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (p. ej. cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante, realizada in vitro o in vivo. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y con propósitos prácticos también, se pueden aislar, por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para el revestimiento de placas de microvaloración para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en el diagnóstico o terapia. Los miembros de unión se pueden glicosilar, sea de forma natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (p. ej. células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o pueden estar no glicosilados (por ejemplo si se producen por expresión en una célula procariota).

[0065] Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo también se pueden usar en la invención. Por ejemplo, dichas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diferentes grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

[0066] Se pueden obtener uno o más miembros de unión para un antígeno, p. ej. la A-FN o el ED-A de fibronectina, poniendo en contacto una biblioteca de miembros de unión de acuerdo con la invención y el antígeno o un fragmento del mismo, p. ej., un fragmento que comprende o consiste en el ED-A o un fragmento de péptido del ED-A, y seleccionando uno o más miembros de unión de la biblioteca que son capaces de unirse al antígeno.

[0067] Una biblioteca de anticuerpos se puede cribar usando el cribado por filtración de colonias iterativo (ICFS). En el ICFS, las bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión se cultivan en un medio líquido y, una vez alcanzado el crecimiento exponencial, se distribuyen varios miles de millones de estas en un soporte de cultivo que consiste en un filtro de membrana previamente tratado de forma adecuada que se incubaba hasta que aparecen las colonias de bacterias completamente confluentes. Un segundo sustrato de captura consiste en otro filtro de membrana, previamente humidificado y cubierto con el antígeno deseado.

[0068] Después, el filtro de membrana de captura se ponen sobre una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se cubre con el filtro de crecimiento con la superficie cubierta con colonias bacterianas apuntando hacia arriba. El sándwich así obtenido se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Por lo tanto, se puede obtener la expresión de los genes que codifican fragmentos de anticuerpo scFv que tienen una acción de expansión, de modo que aquellos fragmentos que se unen específicamente con el antígeno que está presente en la membrana de captura, son capturados. Después, la membrana de captura se trata para señalar los fragmentos de anticuerpo scFv unidos, con técnicas colorimétricas usadas habitualmente para este propósito.

[0069] La posición de las manchas coloreadas en el filtro de captura permite volver a las correspondientes colonias bacterianas que están presentes en la membrana de cultivo y producir los fragmentos de anticuerpos capturados. Dichas colonias se recogen y se cultivan y las bacterias, algunos millones de ellas, se distribuyen sobre una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos antes. Después se llevan a cabo ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana de captura correspondan a colonias positivas individuales, cada una de las cuales representa una fuente potencial de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno usado en la selección. El ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO0246455.

También se puede presentar una biblioteca sobre partículas o complejos moleculares, por ejemplo paquetes genéticos replicables tales como partículas de bacteriófagos (p. ej., T7), u otros sistemas de presentación in vitro, conteniendo cada partícula o complejo molecular el ácido nucleico que codifica el dominio variable VH del anticuerpo presentado en el mismo, y opcionalmente también un dominio VL presentado, si está presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO92/01047 y p. ej. las patentes de EE.UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

[0070] Después de la selección de los anticuerpos capaces de unirse al antígeno y presentados en bacteriófagos u otras partículas o complejos moleculares de bibliotecas, se puede tomar el ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicho anticuerpo seleccionado. Dicho ácido nucleico se puede usar en la posterior producción de un anticuerpo o un dominio variable VH o VL del anticuerpo por expresión del ácido

nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta dicho anticuerpo seleccionado.

[0071] Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho anticuerpo seleccionado, se puede proporcionar en forma aislada, así como en un anticuerpo que comprende dicho dominio VH.

[0072] Se puede ensayar además la capacidad para unirse a la A-FN o el ED-A de fibronectina u otro antígeno o isoforma diana, por ejemplo, la capacidad para competir con p. ej. uno cualquiera de los anticuerpos dirigidos contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 por la unión a la A-FN o un fragmento de la A-FN, p. ej., el ED-A de fibronectina.

[0073] Un anticuerpo para su uso en la invención se puede unir a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina de forma específica. Un anticuerpo para su uso en la invención se puede unir a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con la misma afinidad que el anticuerpo dirigido contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, p. ej. en el formato de scFv, o con una afinidad que es mejor. Un anticuerpo para su uso en la invención se puede unir a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 2×10^{-8} M o una afinidad que es mejor. Más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de $1,7 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Todavía más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}$ M o una afinidad que es mejor. Lo más preferiblemente, un anticuerpo para su uso en la invención se une a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina con una K_D de 3×10^{-9} M o una afinidad que es mejor.

[0074] Un anticuerpo para su uso en la invención se puede unir al mismo epítipo en la A-FN y/o el ED-A de fibronectina que un anticuerpo dirigido contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

[0075] Un anticuerpo para su uso en la invención puede no mostrar ninguna unión significativa a moléculas distintas de la A-FN y/o el ED-A de fibronectina. En particular, el anticuerpo puede no unirse a otras isoformas de fibronectina, por ejemplo la isoforma ED-B y/o la isoforma IIICS de fibronectina.

[0076] Las variantes de moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento se pueden producir y usar en la presente invención. Las técnicas necesarias para hacer sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR, dominios VH y VL de anticuerpo y miembros de unión, en general están disponibles en la materia. Las secuencias variantes se pueden hacer con sustituciones que se puede predecir o no que tienen un efecto mínimo o beneficioso en la actividad, y se puede ensayar la capacidad para la unión a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina y/o cualquier otra propiedad deseada.

[0077] Las variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en el presente documento, se pueden usar de acuerdo con la presente invención como se ha discutido. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, eliminación, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), pueden ser menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, pueden ser 5, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones se pueden hacer en una o más regiones armazón y/o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no producen la pérdida de función, de modo que un miembro de unión que comprende la secuencia de aminoácidos así alterada puede retener la capacidad para unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina. Por ejemplo, puede retener la misma unión cuantitativa que un anticuerpo en el que no se ha hecho la alteración, medido p. ej. en un ensayo descrito en el presente documento. El anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos así alterada puede tener una mejor capacidad para unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

[0078] Las regiones VH o VL nuevas que llevan secuencias derivadas de la CDR, se pueden generar usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados, para generar mutaciones en el dominio variable entero. Por ejemplo, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos en un dominio variable entero o conjunto de CDR. Otro procedimiento que se puede usar es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL.

[0079] Como se ha indicado antes, una secuencia de aminoácidos de la CDR sustancialmente como se expone en el presente documento, se puede llevar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una parte sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como se exponen en el presente documento, se pueden llevar como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano o una parte sustancial del mismo.

[0080] Los dominios variables que se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable

humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable se puede obtener a partir de un anticuerpo no humano. Se puede introducir una secuencia de CDR (p. ej. CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (p. ej. CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la zona del dominio variable, junto con cebadores consenso a la tercera región armazón de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks y col. describen además cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de la CDR3 de la presente invención se pueden barajar con repertorios de dominios de VH y VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados se pueden combinar con un dominio VL o VH cognado para proporcionar miembros de unión. El repertorio después se puede presentar en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047, o cualquiera de un extenso conjunto de bibliografía posterior, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de modo que se pueden seleccionar miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquiera a partir de 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros.

[0081] De forma similar, una o más, o las tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH y VL que después se criba para seleccionar un miembro de unión o miembros de unión para la A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

[0082] Se puede usar una o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9, o el conjunto de HCDR, y/o se puede usar una o más de las X-LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9 o el conjunto de LCDR del anticuerpo H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 o G9.

[0083] Igualmente, se pueden usar otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR descritos en el presente documento.

[0084] La A-FN y/o el ED-A de fibronectina se pueden usar en un cribado de miembros de unión, por ejemplo moléculas de anticuerpo, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón. El cribado puede ser el cribado de un repertorio como se describe en otra parte en el presente documento.

[0085] Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones armazón interpuestas. La parte también puede incluir al menos aproximadamente 50 % de cualquiera o ambas de la primera y la cuarta regiones armazón, siendo 50 % el 50 % C-terminal de la primera región armazón y el 50 % N-terminal de la cuarta región armazón. Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que normalmente no están asociados con regiones del dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de anticuerpos hechos por técnicas de ADN recombinante pueden dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables descritos en otra parte en el presente documento, a secuencias de proteína adicionales incluyendo regiones constantes de anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de fragmentos bivalentes) o marcadores detectables/funcionales como se discute con más detalle en otra parte en el presente documento.

[0086] Aunque los miembros de unión comprenden una pareja de dominios VH y VL, también se describen dominios de unión individuales basados en secuencias de dominios VH o VL. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, en especial los dominios VH, son capaces de unir antígenos diana de una forma específica. Por ejemplo, véase la discusión de los dAb anterior.

[0087] En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios se pueden usar para cribar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse a la A-FN y/o el ED-A de fibronectina. Esto se puede conseguir por procedimientos de cribado de presentación en fagos usando el llamado procedimiento combinatorio dual jerárquico, como se describe en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de presentación en fagos, tales como las descritas en esta referencia. Esta técnica también la describe Marks, 1992.

[0088] Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL se pueden unir en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo incluyendo las cadenas C κ o C λ , p. ej., C λ . Igualmente, un anticuerpo basado en un dominio VH se

puede unir en su extremo C-terminal a toda o parte (p. ej., un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, p. ej., IgG, IgA, IgE e IgM, y cualquiera de las subclases de isotipos, en particular IgG1 e IgG4. Cualquier variante de la región constante sintética u otra que tenga estas propiedades y establezca las regiones variables, también es útil en realizaciones de la presente invención.

[0089] Los anticuerpos para su uso en la invención se pueden marcar con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produce o que puede inducir la producción de una señal, incluyendo, pero sin limitar, agentes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, agentes quimiluminiscentes o fotosensibles. Por lo tanto, la unión se puede detectar y/o medir detectando la fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz. Los marcadores detectables se pueden unir a anticuerpos para su uso en la invención usando procedimientos químicos convencionales conocidos en la materia.

[0090] Hay muchos procedimientos mediante los cuales el marcador puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor y reaccionantes químicos. El marcador también se puede unir a otro miembro de unión que se une al anticuerpo para su uso en la invención, o a un soporte.

[0091] Los anticuerpos marcados, p. ej. scFv marcados con un marcador detectable, se pueden usar con fines de diagnóstico in vivo, ex vivo o in vitro, y/o terapéuticos.

[0092] Por ejemplo, los anticuerpos radiomarcados (p. ej., anticuerpos conjugados con radioisótopos) se pueden usar en el radiodiagnóstico y en radioterapia. Los radioisótopos que se pueden conjugar con un miembro de unión para su uso en la invención incluyen isótopos tales como ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I .

[0093] Por ejemplo, un anticuerpo para su uso en la invención marcado con un marcador detectable se puede usar para detectar, diagnosticar o hacer el seguimiento del cáncer de pulmón en un ser humano o animal.

[0094] Un anticuerpo como se describe en el presente documento, se puede usar para fabricar un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

[0095] La invención también proporciona un anticuerpo para su uso en un procedimiento in vivo de diagnóstico de cáncer de pulmón en un ser humano o animal, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

(a) administrar al ser humano o al animal un miembro de unión de la presente invención, por ejemplo marcado con un marcador detectable, que se una a la isoforma ED-A de fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, y

(b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión en el pulmón del cuerpo humano o animal;

en el que la localización del miembro de unión en el pulmón en el ser humano o animal indica la presencia de cáncer de pulmón.

[0096] Cuando el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, la presencia o ausencia del marcador detectable se puede determinar detectando el marcador.

[0097] En la presente invención se puede usar un conjugado o fusión entre un anticuerpo para su uso en la invención y una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en dichas lesiones. Por ejemplo, la molécula biocida o citotóxica puede ser interleuquina-2 (IL-2), doxorubicina, interleuquina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α) o factor tisular (preferiblemente truncado). Dichos conjugados se pueden usar de forma terapéutica, para el tratamiento del cáncer de pulmón como se ha citado en el presente documento.

[0098] La producción y uso de fusiones o conjugados de anticuerpos con moléculas biocidas o citotóxicas se describe por ejemplo en el documento WO01/62298.

[0099] También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar el cáncer de pulmón, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión.

[0100] El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana por interacción celular, y (ii) un miembro de unión para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina.

[0101] La invención proporciona el uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón.

[0102] El anticuerpo puede estar conjugado o fusionado con una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico como se describe en el presente documento. El miembro de unión puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana por interacción celular, y (ii) un miembro de unión para la fibronectina humana de acuerdo con la presente invención.

[0103] También se describe en el presente documento un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en células diana por interacción celular, y (ii) un anticuerpo para la fibronectina humana de acuerdo con el uso en la presente invención. Dicho conjugado preferiblemente comprende una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y dicho anticuerpo, o cuando el miembro anticuerpo es una cadena doble o cadena múltiple, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un componente de la cadena polipeptídica de dicho anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo es un polipéptido de una cadena, p. ej. una molécula de anticuerpo de una cadena, tal como scFv. También se puede usar en la invención una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo Fv de una cadena.

[0104] La molécula biocida o citotóxica que ejerce su efecto en las células diana por interacción celular, puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor unido a membrana en la célula diana o perturbar el potencial electroquímico de la membrana celular. Las moléculas que interaccionan con un receptor unido a membrana incluyen quimioquinas, citoquinas y hormonas. Los compuestos que perturban el potencial electroquímico de la membrana celular incluyen hemolisina, ionóforos, fármacos que actúan en canales iónicos. En realizaciones preferidas de ejemplo, la molécula es la interleuquina-2, factor tisular (preferiblemente truncado) o doxorubicina. Otras realizaciones pueden usar interleuquina-12, interferón gamma, IP-10 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

[0105] Como se discute con más detalle a continuación, un miembro de unión específico al que se refiere la presente invención, es un anticuerpo. De forma conveniente, el anticuerpo puede ser un polipéptido de una cadena, tal como un anticuerpo de una cadena. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de una cadena y la molécula biocida o citotóxica (p. ej., interleuquina-2 o factor tisular). Un sitio de unión al antígeno del anticuerpo se puede proporcionar mediante la asociación de un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo en polipéptidos separados, por ejemplo en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo tal como Fab o fragmento bivalente. Cuando el anticuerpo es una molécula de dos cadenas o múltiples cadenas (p. ej., Fab o anticuerpo completo, respectivamente), la molécula biocida o citotóxica se puede conjugar como un polipéptido de fusión con una o más cadenas de polipéptido en el anticuerpo.

[0106] El anticuerpo se puede conjugar con la molécula biocida o citotóxica mediante un enlace peptídico, es decir, en un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específico o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Véase Taniguchi y col. (1983) *Nature* 302, 305 – 310; MaED-A y col. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040 – 1047; Devos y col. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11: 4307 – 4323 para la información de la secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL-2. La información de la secuencia para el factor tisular truncado se proporciona en Scarpati y col. (1987) *Biochemistry* 26: 5234 – 5238, y Ruf y col. (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 15719 – 15725. Otros medios de conjugación incluyen la conjugación química, en especial la reticulación usando un reactivo bifuncional (p. ej. usando DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

[0107] Cuando se desea la liberación lenta, por ejemplo cuando la molécula biocida o citotóxica es doxorubicina u otra molécula que perturba el potencial electroquímico de la membrana celular, la conjugación química puede ser mediante la formación de una base de Schiff (imina) entre un grupo amino primario del anticuerpo y un resto de azúcar oxidado (daunosamina) de la molécula biocida o citotóxica tal como la doxorubicina.

[0108] También se describe en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión para su uso en la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Un ácido nucleico puede codificar una CDR o conjunto de CDR, o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno del anticuerpo o molécula de anticuerpo, p. ej., scFv o IgG, p. ej. IgG1, como se ha definido antes. La secuencia de nucleótidos puede codificar los dominios VH y/o VL descritos en el presente documento.

[0109] También se describen en el presente documento construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión, que comprenden al menos un polinucleótido como se ha descrito antes.

[0110] También se describe una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como las anteriores. Se describe un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno del anticuerpo o molécula de anticuerpo, p. ej., scFv o IgG1 o IgG4 como antes, así como un procedimiento para producir el producto codificado, cuyo procedimiento comprende la expresión del ácido

nucleico codificante. La expresión se puede conseguir de forma conveniente mediante cultivo en condiciones adecuadas de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, se puede aislar y/o purificar un dominio VH o VL, o miembro de unión, usando cualquier técnica adecuada, y después usarlo según convenga.

[0111] Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento, abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que la T se sustituye por el U, salvo que el contexto requiera lo contrario.

[0112] También se describe un procedimiento de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, en el que el procedimiento incluye producir la expresión de un ácido nucleico codificante. Dicho procedimiento puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

[0113] Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un procedimiento de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0114] Los sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas está bien establecido en la materia. Para una revisión véase, por ejemplo, Plückthun 1991. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

[0115] También es posible para los expertos en la materia la expresión en células eucariotas en cultivo, como una opción para la producción de un miembro de unión, por ejemplo Chadd y Chamow (2001), Andersen y Krummen (2002), Larrick y Thomas (2001). Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células renales embrionarias humanas, células de retina embrionaria humana y muchas otras.

[0116] Los vectores adecuados se pueden elegir o construir para que contengan las secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, p. ej. fagémidos, o víricos p. ej., fago, según sea adecuado. Para más detalles véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001). Se describen en detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y el análisis de proteínas, en Ausubel 1999.

[0117] Una célula huésped puede contener un ácido nucleico como se describe en el presente documento. Dicha célula huésped puede estar in vitro y puede estar en cultivo. Dicha célula huésped puede estar in vivo. La presencia in vivo de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de un miembro de unión para su uso en la presente invención como "intra-anticuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los anticuerpos intracelulares se puede usar para la terapia génica.

[0118] También se describe un procedimiento que comprende introducir un ácido nucleico descrito en el presente documento en una célula huésped. La introducción puede usar cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, p. ej., virus vaccinia, o para células de insecto, baculovirus. Para la introducción del ácido nucleico en la célula huésped, en particular en una célula eucariota, se puede usar un sistema vírico o basado en plásmido. El sistema plasmídico se puede mantener de forma episomal o se pueden incorporar en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración aleatoria o dirigida de una o más copias en un solo locus o múltiples locus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transcripción usando bacteriófagos.

[0119] A la introducción le puede seguir el producir o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo cultivando las células huésped en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr por procedimientos conocidos para el experto en la materia.

[0120] El ácido nucleico se puede integrar en el genoma (p. ej., cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover por inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

[0121] También se describe un procedimiento que comprende usar una construcción, como se ha expuesto antes, en un sistema de expresión con el fin de expresar un anticuerpo o polipéptido como se ha descrito antes.

[0122] El anticuerpo para su uso en la presente invención se diseña para su uso en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo en el ser humano.

[0123] Alternativamente, los anticuerpos para su uso en la invención se pueden usar en el diagnóstico o tratamiento del cáncer de pulmón.

[0124] Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un anticuerpo en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un procedimiento para la preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos, y el experto en la materia los adaptará en función de la naturaleza y el modo de administración del o de los compuestos elegidos.

[0125] Los anticuerpos para su uso en la presente invención normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para el experto en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada o por inyección, p. ej., intravenosa.

[0126] Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tal como por ejemplo nanocuerpos, etc. también se contemplan en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas en general comprenden un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

[0127] Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de la afección, el principio activo puede estar en forma de una disolución acuosa aceptable para la vía parenteral que está exenta de pirógenos y tiene pH adecuado, isotonicidad y estabilidad. Los expertos en la materia podrán preparar disoluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden usar conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. Los expertos en la materia conocen muchos procedimientos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, p. ej., Robinson, 1978.

[0128] Se puede administrar una composición sola o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial, o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección que se va a tratar.

[0129] Se puede usar un anticuerpo para su uso en la presente invención como parte de una terapia de combinación junto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar efectos sinérgicos significativos, en particular la combinación de un anticuerpo para su uso en la presente invención con uno o más fármacos distintos. Un anticuerpo para su uso en la presente invención se puede administrar de forma simultánea o secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las afecciones listadas en el presente documento.

[0130] Alternativamente, un anticuerpo para su uso en la invención se puede usar en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento del cáncer de pulmón.

[0131] Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de cánceres de pulmón de células no pequeñas incluyen: cisplatino o carboplatino, en combinación con gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etopósido o vinorelbina. Los agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de cánceres de pulmón de células pequeñas incluyen: cisplatino o etopósido, sea solo o en combinación con carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, vinorelbina, topotecán o irinotecán.

[0132] Se puede usar un anticuerpo para su uso en la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores para la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo, y por consiguiente puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Las preparaciones separadas se pueden usar para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permite la administración de los componentes por vías diferentes, p. ej., la administración oral y parenteral.

[0133] De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas se pueden administrar a mamíferos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y el esquema de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro de la composición, el tipo de miembro de unión, el procedimiento de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones de la dosificación etc., se basa en la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o el avance de la enfermedad que se está tratando. Las dosis adecuadas de anticuerpo son bien conocidas en la materia (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Se pueden usar las dosificaciones específicas indicadas en el presente documento o en Physician's Desk Reference (2003) según sean adecuadas para el tipo de medicamento que se va a administrar. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un miembro de unión para su uso en la invención, se puede determinar comparando su actividad in vitro y la actividad in vivo en un modelo animal. Son conocidos los procedimientos de extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a seres humanos. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, incluyendo si el anticuerpo es para el diagnóstico, prevención o para el tratamiento, el tamaño y localización de la zona que se va a tratar, la naturaleza exacta del anticuerpo (p. ej., anticuerpo entero, fragmento o fragmento bivalente), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis menores. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo entero, p. ej., el isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar de forma proporcional para niños y bebés, y también se puede ajustar para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir diariamente, dos veces por semana, semanalmente o en intervalos mensuales, a discreción del médico. Los tratamientos pueden ser cada 2 a 4 semanas para la administración subcutánea y cada 4 a 8 semanas para la administración intravenosa. En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el periodo entre administraciones es de aproximadamente 2 semanas o más, p. ej., aproximadamente 3 semanas o más, aproximadamente 4 semanas o más, o aproximadamente 1 vez al mes. En otras realizaciones de la invención, el tratamiento se puede dar antes y/o después de cirugía, y se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico de tratamiento quirúrgico.

[0134] Otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia, dada la presente descripción que incluye los siguientes ejemplos experimentales.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Anticuerpos

[0135] El aislamiento del fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra ED-B (L19) se ha descrito previamente (Pini y col. 1998). El anticuerpo dirigido contra ED-A original se aisló de la biblioteca ETH-2 usando procedimientos publicados (Giovannoni, *Nucleic. Acid Research*, 2001, 29(5): E27). La maduración de la afinidad del anticuerpo dirigido contra ED-A original, que produce la alta afinidad de los anticuerpos dirigidos contra ED-A, se describe en la siguiente sección.

Maduración de la afinidad del anticuerpo dirigido contra ED-A original

[0136] El anticuerpo dirigido contra ED-A original (un anticuerpo derivado de ETH-2) se usó como molde para la construcción de una biblioteca de maduración de la afinidad. La variabilidad de secuencia en la CDR1 de VH (línea germinal DP47) y CDR1 de VL (línea germinal DPK22) de la biblioteca se introdujo por PCR usando los cebadores parcialmente degenerados 5'-CTGGAGCCTGGCGACCCAGCTCATMNNMNNMNGCTAAAGGTGAAT CCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) para VH y 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAA MNNMNNMNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) para VL (todos los oligonucleótidos se adquirieron en Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania), en un procedimiento que genera mutaciones aleatorias en las posiciones 31, 32 y 33 de la CDR1 de VH y en las posiciones 31, 31a y 32 de la CDR1 de VL. Las combinaciones VHVL se ensamblaron en un formato de scFv por ensamblaje por PCR usando los cebadores LMB3long (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) y fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), usando segmentos de VH y VL purificados en gel como moldes. Los fragmentos de VH-VL ensamblados se trataron por digestión doble con NcoI/NotI y se clonaron en el vector fagémido pHEN1 digerido con NcoI/NotI (Hoogenboom y col., 1991). El producto de ligado resultante se electroporó en células TG-1 de *E. coli* electrocompetentes de acuerdo con (Viti y col., 2000), produciendo una biblioteca que contenía $1,5 \times 10^7$ clones de anticuerpo individuales, en la que se cribaron los anticuerpos que se unían al ED-A con una afinidad mejorada.

Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A

[0137] En la biblioteca de anticuerpos descrita antes se cribaron los anticuerpos que se unían a ED-A con una afinidad mayor que el anticuerpo dirigido contra ED-A original usando análisis de BIAcore. El antígeno (11A12) usado en el análisis de BIAcore contenía el dominio ED-A de fibronectina humana y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 120):

MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ
 TEMTIEGLQPTVEYVSVYAQNPSGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWES
 PQGQVSRVRYTSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL
 IGTQSTAI PAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
 SSVVVSGLMVATKYEVS VYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH

[0138] La secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12) (SEQ ID NO: 121) es como sigue:

atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaaca
 gcattagtgtcaagtggctgccttcaagttcccctgttactggttacagagtaaccaccactcccaa
 aatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactattgaagggc

 ttgcagcccacagtggagtattgtggttagtgtctatgctcagaatccaagcggagagagtcagcctc
 tggttcagactgcagtaaccaacattgatcgccctaaaggactggcattcactgatgtggatgtcga
 ttccatcaaaattgcttgggaaagcccacaggggcaagtttccaggtacaggggtgacctactcgagc
 cctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatgggtgaagaagacactgcagagctgcaag
 gcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggttgccctgcacgatgatatggagagccagcc
 cctgattggaaccagtcacagctatttctgcaccaactgacctgaagttcactcaggtcacaccc
 acaagcctgagcgcgccagtgagacaccaccaatgttcagctcactggatatcgagtgcgggtgaccc
 ccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctgacagctcatccgtgggtgtatc
 aggacttatggtggccaccaaataatgaagtgagtgctctatgctcttaaggacactttgacaagcaga
 ccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

[0139] La secuencia de nucleótidos del antígeno se amplificó por PCR usando cebadores que contenían los sitios de restricción BamHI y BglII en 5' y 3' respectivamente. El producto de la PCR resultante y el vector pQE12 (QIAGEN) se digirieron con las endonucleasas de restricción BamHI y BglII y posteriormente se ligaron en una reacción que contenía una relación de inserto a vector de 3: 1. El vector resultante se secuenció para comprobar que la secuencia era correcta.

[0140] El antígeno se preparó como sigue:

Se electroporó un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1 %, en presencia de 1 µl de una miniprep de ADN 11A12. Después el precultivo se diluyó 1: 100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, glucosa al 0,1 %) y se cultivó hasta una DO600 de 0,4-0,6 y después se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se centrifugaron y se filtró el líquido sobrenadante (Millipore 0,22 µm). Después de centrifugación y clarificación del caldo de cultivo, se purificó 11A12 usando una columna Hitrap en FPLC. La columna de Ni/ se regeneró como sigue: la columna se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de H₂O seguido de la aplicación de 3 VC de EDTA 0,5 M/Tris 0,2 M pH 8 para eliminar por lavado el níquel viejo de la columna. A esto le siguió el lavado de la columna con 5 VC de H₂O. Después la columna se volvió a cargar con 2 VC de NiSO₄ 100 mM seguido de lavado de la columna con varios VC de H₂O. Después la columna se equilibró con 5 VC de tampón de lisis (imidazol 20 mM/NaCl 250 mM/PBS pH 7,4). El lisato celular se filtró (Millipore 0,45 µm) y se cargó en la columna (manualmente). Después la columna se volvió a poner en el FPLC y se dejó fluir el tampón de lisis hasta que la

señal de UV era estable (constante), aproximadamente 3 VC. Se inició entonces el programa de elución: gradiente de 0 % a 100 % de tampón de elución (imidazol 400 mM/NaCl 250 mM/PBS pH 7,4) en 5 VC. Las fracciones que contenían el antígeno eluido se mezclaron y se dializaron en PBS durante la noche.

5 Expresión y purificación de los anticuerpos dirigidos contra ED-A

[0141] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A se expresaron y purificaron como sigue: Se electroporó un precultivo electrocompetente de TG1 en 10 ml de 2TY, Amp, glucosa al 1 %, en presencia de 1 μ l de una miniprep de ADN de uno de los anticuerpos dirigidos contra ED-A. Después el precultivo se diluyó 1: 100 (8 ml en 800 ml de 2TY, Amp, glucosa al 0,1 %) y se cultivó hasta una DO600 de 0,4-0,6 y después se indujo con IPTG durante la noche. Al día siguiente, las células se centrifugaron y se filtró el líquido sobrenadante (Millipore 0,22 μ m). El scFv se purificó en una columna de proteína A-Sepharose y se usó trietilamina para eluir los scFv de la columna. Las fracciones que contenían los scFv eluidos se dializaron en PBS durante la noche a 4 °C. Las fracciones de scFv después se pusieron en una columna Superdex 75 con PBS fluyendo a 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,25 ml. Se usaron las fracciones monoméricas para el análisis de BIAcore.

Análisis de BIAcore 1

[0142] El chip de BIAcore se lavó por arrastre durante la noche con un caudal de 5 μ l/min de tampón de HBS-EP de BIAcore, Hepes 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 % (el mismo tampón usado para el ensayo). El antígeno (11A12) se diluyó hasta una concentración de 50 μ g/ml en tampón de acetato (pH 4,0) y los grupos COOH en el chip se activaron por inyección de 50 μ l de una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y etil-N-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Se inyectaron 40 μ l del antígeno 11A12 sobre el chip y los grupos COOH libres residuales se bloquearon con 30 μ l de etanolamina. Después de una filtración a través de 0,22 μ m, se inyectaron 20 μ l de cada líquido sobrenadante bacteriano individual sobre el chip y la interacción con el antígeno se siguió en tiempo real.

Análisis de BIAcore 2

[0143] Se evaluaron las k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo dirigido contra ED-A original y los anticuerpos dirigidos contra ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9, usando resonancia de plasmón de superficie. El chip se equilibró durante la noche con el mismo tampón usado durante el ensayo con un caudal de tampón de 5 μ l/min. El procedimiento de recubrimiento entero se llevó a cabo con este flujo. El antígeno 11A12 se diluyó 1: 25 con tampón de acetato pH 4,00 (proporcionado por BIAcore) hasta una concentración final de 20 μ g/ml. Después se mezclaron la NHS y EDC y se inyectaron 50 μ l para activar los grupos COOH en el chip CM5. A esto le siguió la inyección de 40 μ l del antígeno (esto dura aproximadamente 40 min). Después se inyectaron 30 μ l de etanolamina con el fin de bloquear la reactividad de los posibles COOH libres.

[0144] Cada muestra se ensayó con un caudal de 20 μ l/min. Se inyectaron 20 μ l de la proteína monomérica no diluida (como sale del gel de filtración). Se dejó que transcurriera un tiempo de disociación de aproximadamente 200 min. Después se inyectaron 10 μ l de HCl 10 mM para regenerar el chip. La inyección de la proteína monomérica se repitió con diferentes diluciones, es decir, dilución 1: 2 (en PBS) seguido de regeneración con HCl. A esto le siguió una tercera inyección de proteína, con una dilución 1: 4 seguido de nuevo de la regeneración con HCl. Los valores de las k_{on} , k_{off} y K_D para cada anticuerpo dirigido contra ED-A se evaluaron usando el software BIAevaluation.

Inmunohistoquímica de secciones de linfoma

[0145] Se fijaron secciones de linfoma de Ramos en acetona fría (-20 °C) durante 10 minutos y después los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente (T_a) durante 30 minutos. Después los portaobjetos se sumergieron en TBS durante 5 a 10 minutos y después la parte posterior de los portaobjetos se secó con papel sin tocar las secciones. A esto le siguió el bloqueo de las secciones con > 100 μ l de suero de ternero fetal al 20 % (FCS) en TBS (TRIS 50 mM, NaCl 100 mM, ajustado a pH 7,4, aprotinina al 0,01 %) durante 30 minutos. Se vació la disolución de bloqueo y los portaobjetos se sumergieron en TBS durante 5 min. Después se añadieron a los portaobjetos 100 μ l de anticuerpo scFv primario F8 (~ 20 ng/ μ l) que llevaba un marcador myc, junto con 10 μ l de anticuerpo dirigido contra myc biotinilado 9E10 (DO 0,25, diluido 1: 20) diluido en TBS/BSA al 3 %. Como control negativo, se realizó la tinción inmunohistoquímica de una sección de linfoma de Ramos de la misma forma pero omitiendo el anticuerpo primario, es decir el anticuerpo scFv dirigido contra ED-A F8 marcado con myc. Los portaobjetos se incubaron en una cámara con humedad durante 1 h. Los portaobjetos se lavaron con TBS seguido de la adición de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1: 150 en TBS/BSA al 3 % e incubación en una cámara con humedad durante 30 min. Después los portaobjetos se lavaron con TBS dos veces durante 5 min y la parte posterior de los portaobjetos se secó con papel. Se añadieron a cada portaobjetos 500 μ l del sustrato Fast Red (5 mg de polvo de FastRed añadidos a 5 ml de disolución de Fast Red [49 ml de TRIS-HCl, 0,1M, pH 8,2; 1,0 ml de N,N-dimetilformamida; 10 mg de fosfato de naftol AS-MX y 50 μ l de disolución de levamisol (1 ml de TRIS-HCl 0,1 M pH

8,2, 240,8 mg de polvo de levamisol)] y se filtraron con un filtro con un tamaño de poros de 0,45 μ l, y los portaobjetos se incubaron en una cámara con humedad durante 15 min. Los portaobjetos se lavaron 2 veces con agua desionizada, aplicando directamente el agua desionizada en cada sección con una pipeta Pasteur de plástico y después se dejaron en agua. Después los portaobjetos se transfirieron a una disolución de hematoxilina Gillis durante 50 min, seguido de una transferencia rápida a agua y lavado con agua 6 veces. Finalmente los portaobjetos se montaron en medio de montaje Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Suiza) usando el software Axiovision (Carl Zeiss).

Tinción inmunohistoquímica de secciones de cáncer de pulmón

[0146] Se realizó la tinción inmunohistoquímica de secciones de un cáncer de pulmón de células pequeñas (carcinoma de células pequeñas) y de varios cánceres de pulmón de células no pequeñas (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células grandes) con un anticuerpo scFv dirigido contra ED-A que lleva un marcador myc, como se ha descrito previamente (véase, p. ej., Brack y col. 2006). Brevemente, las secciones se incubaron con el anticuerpo scFv dirigido contra ED-A D5 (concentración final, 2-15 μ g/ml) y con el anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal dirigido contra myc 9E10) simultáneamente. Se detectaron los anticuerpos unidos con anticuerpo de conejo dirigido contra inmunoglobulina de ratón (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca) seguido de complejo de fosfatasa alcalina-anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra fosfatasa alcalina (Dakocytomation). Se usó Fast Red (Sigma) como sustrato de fosfatasa, y las secciones se contratiñeron con hematoxilina (Sigma). Finalmente, las secciones se montaron en Glycergel (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y se analizaron con un microscopio Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Switzerland) usando el software Axiovision (Carl Zeiss).

RESULTADOS

Selección de anticuerpos dirigidos contra ED-A

Análisis de BIAcore 1

[0147] El análisis de BIAcore produjo una gráfica para cada anticuerpo dirigido contra ED-A que se analizó para deducir la afinidad de un anticuerpo por el antígeno, como sigue: El eje x de cada gráfica corresponde al tiempo y el eje y corresponde a unidades de resonancia (una medida que indica la afinidad de unión del anticuerpo ensayado por el antígeno en forma de recubrimiento sobre el chip BIAcore). Cada gráfica mostraba 3 máximos y 1 mínimo que corresponde a los cambios de tampón y por lo tanto es irrelevante para la interpretación de los resultados.

[0148] La parte ascendente de cada gráfica representa la fase de asociación. Cuanto más pronunciada es la curva en esta parte de la gráfica, más rápida es la asociación del anticuerpo con el antígeno. La parte descendente de cada gráfica representa la fase de disociación del anticuerpo del antígeno. Cuando más plana es la curva en esta parte de la gráfica, más lenta es la disociación del anticuerpo del antígeno.

[0149] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 presentan todos una curva de disociación más plana que la del anticuerpo dirigido contra ED-A original del cual derivan, indicando que se unen a ED-A, y por lo tanto también a A-FN, con una afinidad mayor que el anticuerpo dirigido contra ED-A original. Las gráficas para los anticuerpos E5, F1, F8 y H1 mostraban las curvas de disociación más planas de todos los anticuerpos dirigidos contra ED-A ensayados. Las curvas de asociación de los anticuerpos H1, C5, D5, E5, C8, F8 y F1 eran más planas que la observada para el anticuerpo dirigido contra ED-A original, mientras que la curva de asociación observada para los anticuerpos B2, B7, E8 y G9 era tan pronunciada como la curva de asociación observada para el anticuerpo dirigido contra ED-A original. Sin embargo, puesto que se usaron los líquidos sobrenadantes bacterianos de células TG-1 de *E. coli* inducidas con IPTG para el análisis de BIAcore de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9, la concentración de las muestras de anticuerpos ensayadas no era conocida, pero lo más probablemente era menor que la concentración de la muestra del anticuerpo dirigido contra ED-A original usada para la comparación. Por consiguiente, la curva de asociación de los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 puede ser artificialmente baja debido a la baja concentración de anticuerpo en las muestras usadas para el análisis de BIAcore. Sin embargo, puesto que la concentración no afecta significativamente a la disociación de un anticuerpo de su antígeno diana en el análisis de BIAcore, las curvas de disociación planas observadas para los anticuerpos H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 muestran que estos anticuerpos se unen al ED-A con al menos igual, y probablemente mayor afinidad, que el anticuerpo dirigido contra ED-A original.

Análisis de BIAcore 2

[0150] Se evaluaron los valores de k_{on} , k_{off} y K_D de cada anticuerpo dirigido contra ED-A usando el software BIAevaluation. Los valores de k_{on} , k_{off} y K_D del anticuerpo dirigido contra ED-A original y los anticuerpos dirigidos contra ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 para el antígeno 11A12 se detallan en la tabla 2. Los anticuerpos dirigidos

contra ED-A B2, C5, D5, C8, F8, B7 y G9 tienen todos mejores valores de K_D para el antígeno 11A12 que el anticuerpo dirigido contra ED-A original del cual derivan, indicando que se unen al ED-A, y por lo tanto a la A-FN con mayor afinidad que el anticuerpo dirigido contra ED-A original.

5 *Inmunohistoquímica de secciones de linfoma*

[0151] La tinción inmunohistoquímica de secciones de linfoma de Ramos humano primario (linfoma de linfocitos B de no Hodgkin [linfoma de Burkitt]) con anticuerpo scFv dirigido contra ED-A F8 mostró una tinción fuerte y específica de la neovascularización. En cambio, no se detectó tinción del linfoma de Ramos primario, incluyendo la neovascularización, en el control negativo en el que el linfoma de Ramos primario se tiñó en las mismas condiciones excepto por la omisión del anticuerpo scFv dirigido contra ED-A F8. Esto demuestra que los anticuerpos scFv dirigidos contra ED-A de la presente invención se dirigen específicamente a la neovascularización de los linfomas. Por lo tanto, el ED-A puede servir como una diana general para el miembro de unión (p. ej., anticuerpo), basándose en estrategias de dirigirse al linfoma.

15 *Inmunohistoquímica de secciones de cáncer de pulmón*

[0152] En general es difícil encontrar “anticuerpos pantumorales” en una determinada clase de cáncer, por ejemplo la herceptina tiñe solo 20 % de los cánceres de mama. La figura 1 muestra que el anticuerpo dirigido contra ED-A F8 se localiza específicamente en la neovascularización de los cánceres de pulmón. Específicamente, el anticuerpo dirigido contra ED-A F8 se localiza específicamente en la neovascularización tanto del cáncer de pulmón de células pequeñas como del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los cánceres de pulmón de células no pequeñas dan cuenta de ~75 % - 85 % de los cánceres de pulmón, mientras que los cánceres de pulmón de células pequeñas dan cuenta de 15 % - 25 %. La figura 1 demuestra además que el anticuerpo dirigido contra ED-A se localiza específicamente en todos los subtipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas ensayados, en concreto carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar y carcinoma de células grandes. Por lo tanto, los resultados mostrados en la figura 1, demuestran sorprendentemente que el anticuerpo dirigido contra ED-A, F8, tiñe todos los histotipos de cáncer de pulmón ensayados. Por lo tanto el ED-A puede servir como una diana general para el miembro de unión (p. ej., anticuerpo), basándose en estrategias de dirigirse al cáncer de pulmón.

30 *Secuenciación*

[0153] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son todos anticuerpos scFv y se secuenciaron usando procedimientos convencionales. La secuencia de nucleótidos del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en la Figura 3. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 se muestra en la Figura 4.

[0154] Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican el VH y/o VL de los anticuerpos dirigidos contra ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican el VH y/o VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1, excepto que la secuencia de nucleótidos que codifica las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituye por la secuencia de nucleótidos que codifica las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) listada en la Tabla 1, para el anticuerpo respectivo.

[0155] Las secuencias de nucleótidos preferidas que codifican el VH y/o VL del fragmento bivalente scFv dirigido contra ED-A F8 son idénticas a las secuencias de nucleótidos que codifican el VH y/o VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1, excepto que la secuencia de nucleótidos que codifica las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de nucleótidos que codifican las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) listadas en la Tabla 1, para el anticuerpo dirigido contra ED-A F8. La secuencia de nucleótidos preferida que codifica el conector que une el VH y VL del fragmento bivalente scFv dirigido contra ED-A F8 es gggtccagtggcggt (SEQ ID NO: 29).

[0156] Los anticuerpos dirigidos contra ED-A B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 y G9 tienen secuencias de aminoácidos idénticas al anticuerpo dirigido contra ED-A H1, excepto que las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) listadas en la Tabla 1, para el anticuerpo respectivo. La secuencia de aminoácidos del fragmento bivalente scFv dirigido contra ED-A F8 es idéntica a las secuencias de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra ED-A H1, excepto que las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de H1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) se sustituyen por las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de la cadena ligera (VL) y pesada (VH) listadas en la Tabla 1, para el anticuerpo dirigido contra ED-A F8, y la secuencia de aminoácidos del conector en H1 se sustituye por la secuencia de aminoácidos del conector GSSGG (SEQ ID NO: 28).

[0157] La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A B2 (SEQ ID NO: 21) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 23.

- 5 **[0158]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C5 (SEQ ID NO: 41) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 43.
- [0159]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A D5 (SEQ ID NO: 51) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 53.
- 10 **[0160]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E5 (SEQ ID NO: 61) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 63.
- 15 **[0161]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C8 (SEQ ID NO: 71) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 73.
- [0162]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F8 (SEQ ID NO: 81) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 83. El dominio VH del fragmento bivalente dirigido contra ED-A F8 tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F8 (es decir, SEQ ID NO: 81).
- 20 **[0163]** La secuencia de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra el dominio VH del ED-A F1 (SEQ ID NO: 91) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 93.
- 25 **[0164]** La secuencia de aminoácidos del anticuerpo dirigido contra el dominio VH del ED-A B7 (SEQ ID NO: 101) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 103.
- 30 **[0165]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E8 (SEQ ID NO: 111) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 113.
- 35 **[0166]** La secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A G9 (SEQ ID NO: 31) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VH de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 33.
- 40 **[0167]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B2 (SEQ ID NO: 22) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 26.
- 45 **[0168]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C5 (SEQ ID NO: 42) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 46.
- [0169]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A D5 (SEQ ID NO: 52) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 56.
- 50 **[0170]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E5 (SEQ ID NO: 62) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 66.
- 55 **[0171]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C8 (SEQ ID NO: 72) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 76.
- 60 **[0172]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F8 (SEQ ID NO: 82) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 86. El dominio VL del fragmento bivalente dirigido contra ED-A F8 tiene la misma secuencia de aminoácidos que el dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F8 (es decir, la SEQ ID NO: 82).

[0173] La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F1 (SEQ ID NO: 92) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 96.

5 **[0174]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B7 (SEQ ID NO: 102) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 106.

10 **[0175]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E8 (SEQ ID NO: 112) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 116.

15 **[0176]** La secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A G9 (SEQ ID NO: 32) es idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1 excepto que la CDR1 de VL de H1 se sustituye por la SEQ ID NO: 36.

20 **[0177]** Opcionalmente, el aminoácido en la posición 5 del dominio VH de los anticuerpos dirigidos contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el fragmento bivalente scFv F8 puede ser un resto de leucina (L) en lugar de un resto de valina (V) como se muestra en la figura 4A. Además o alternativamente, el aminoácido en la posición 18 del dominio VL de los anticuerpos dirigidos contra ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 y el fragmento bivalente scFv F8 puede ser un resto de arginina (R) en lugar de un resto de lisina (K) como se muestra en la figura 4C.

REFERENCIAS

- 25 **[0178]**
- Amit y col. (1986), *Science*, 233: 747 – 753.
- Andersen y col. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117
- 30 Ausubel y col. (1999) 4th eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
- Bagshawe K.D. y col. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915 – 922
- Balza y col. (1988), *FEBS Lett.*, 228: 42 – 44.
- Birchler y col. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231, 239 – 248.
- 35 Bird y col. (1988) *Science*, 242, 423 – 426
- Borsi y col. (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595 – 600.
- Borsi y col. (1990), *FEBS Lett.*, 261: 175 – 178.
- Borsi y col. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270: 6243 – 6245.
- Borsi y col. (1998), *Exp. Cell Res.*, 240, 244 – 251.
- 40 Brack y col. (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 3200 – 3208.
- Carnemolla y col. (1989), *J. Cell. Biol.*, 108: 1139 – 1148.
- Caton y col. (1990), *J. Immunol.*, 144: 1965 – 1968.
- Chadd y col. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188 – 194
- Chothia y col. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901 – 917.
- 45 Chothia y col. (1989), *Nature*, 342: 877 – 883.
- Devos y col. (1983), *Nucl. Acids Res.* 11: 4307 – 4323.
- French-Constant (1995), *Exp. Cell Res.*, 221, 261 – 271.
- Giovannoni, *Nucleic. Acid Research*, 2001, 29(5): E27.
- Glennie M J y col., 1987 *J. Immunol.* 139, 2367 – 2375
- 50 Haan y col. (2004), *BioCentury*, 12(5): A1 – A6.
- Hanahan y col. (2000), *Cell* 100, 57 – 70.
- Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor
- Kornblihtt y col. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853 – 5868. Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
- Heikinheimo y col. (1991), *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61, 101 – 109.
- 55 Holliger y Bohlen 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18: 411 – 419.
- Holliger y col. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444 – 6448.
- Holliger y col. (1993b), *Current Opinion Biotechnol* 4, 446 – 449.
- Holt y col. (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484 – 490.
- Hoogenboom y col. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19 (15) 4133 – 7.
- 60 Hu y col. (1996), *Cancer Res.*, 56, 3055 – 3061.
- Huston y col. (1988) *PNAS USA*, 85, 5879 – 5883.
- Hynes, R.O. (1990). *Fibronectins* (New York: Springer-Verlag).
- Jacobs y col. (2002), *Hum. Pathol.*, 33, 29 – 38.
- Kabat y col. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Edition. US Department of Health and

Human Services.

Kabat y col. (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)

Kabat y col. (1991b), *J. Immunol.*, 147: 1709 – 1719.

5 Kaspar y col. (2006), *Int. J. Cancer*, 118, 1331 – 1339.

Knappik y col., (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57 – 86.

Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 – 497, 1975

Koide y col. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141 – 1151.

Kontermann y col. (2001), S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545.

10 Koukoulis y col. (1993), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 25, 285 – 295.

Koukoulis y col. (1995), *Ultrastruct. Pathol.*, 19, 37 – 43.

Krebs y col. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254 67 – 84.

Larrick JW y Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 411 – 418.

Ledermann J.A. y col. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659 – 664

15 Lohi y col. (1995), *Int. J. Cancer*, 63, 442 – 449.

MaED-A y col. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040 – 1047.

Matsumoto y col. (1999), *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 320 – 325.

McCafferty y col., (1990) *Nature*, 348, 552 – 554.

Mendez, M. y col., (1997) *Nature Genet.*, 15(2): 146 – 156.

20 Merchand y col., 1998 *Nature Biotech.* 16: 677 – 681.

Neri, D., y Bicknell, R. (2005), *Nat. Rev. Cancer* 5, 436 – 446.

Nygren y col. (1997), *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463 – 469.

Oyama y col. (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 10331 – 10334.

Paoella y col. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545 – 3557.

25 Pini y col. (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 21769 – 21776.

Plückthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545 – 551.

Reiter y col. (1996), *Nature Biotech.*, 14, 1239 – 1245.

Repp y col., 1995 *J. Hemat.* 377 – 382.

Ridgeway y col. (1996), *Protein Eng.*, 9, 616 – 621.

30 Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

Roesli y col. (2006), *Nature Protocols*, 1, 192 – 199.

Ruf y col. (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 15719 – 15725.

Rybak y col. (2005), *Nat. Methods*, 2, 291 – 298.

Rybak y col. (2006), *Chem. Med. Chem.*, 2,22 – 40.

35 Sambrook y Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Scarpati y col. (1987) *Biochemistry* 26: 5234 – 5238.

Scarpino y col. (1999) *J. Pathol.* 188, 163 – 167.

Scheurer y col. (2005), *Proteomics* 5, 3035 – 3039.

40 Segal y col. (1974), *PNAS*, 71: 4298 – 4302.

Sharon y col. (1990a), *PNAS*, 87: 4814 – 4817.

Sharon y col. (1990b), *J. Immunol.*, 144: 4863 – 4869.

Silacci y col. (2003), *Proteomics*, 5, 2340 – 2350.

Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 *PNAS* 83.

45 Suresh y col., 1986 *Method Enzymol.* 121: 210 – 228

Taniguchi y col. (1983) *Nature* 302, 305 – 310.

Tavian y col. (1994), *Int. J. Cancer*, 56, 820 – 825.

Terrana y col. (1987), *Cancer Res.* 47, 3791 – 3797.

Thorpe (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10, 415 – 427.

50 Trachsel y col. (2006), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 735 – 754.

Viti y col. (2000), *Methods Enzymol.*, 326, 480 – 505.

Ward y col. (1989), *Nature* 341, 544 – 546.

Wess In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1 – A7, 2004

Tabla 1

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las CDR1 de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de los anticuerpos dirigidos contra ED-A con maduración de afinidad						
Anticuerpo	CDR1 (VH)			CDR1 (VL)		
H1	CCG P	CGG R	AGG R (SEQ ID NO: 3)	TCT S	GCG A	TGG W (SEQ ID NO: 6)
B2	GCG A	GCT A	AAG K (SEQ ID NO: 23)	GTG V	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 26)
C5	CCG P	ATT I	ACT T (SEQ ID NO: 43)	TTG L	CAT H	TTT F (SEQ ID NO: 46)
D5	GTG V	ATG M	AAG K (SEQ ID NO: 53)	AAT N	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 56)
E5	ACT T	GGT G	TCT S (SEQ ID NO: 63)	CTT L	GCG A	CAT H (SEQ ID NO: 66)
C8	CTT L	CAG Q	ACT T (SEQ ID NO: 73)	CTT L	CCT P	TTT F (SEQ ID NO: 76)
F8	CTG L	TTT F	ACG T (SEQ ID NO: 83)	ATG M	CCG P	TTT F (SEQ ID NO: 86)
F1	TAG Q (Amber)	GCG	CGT A R (SEQ ID NO: 93)	GCG A	CCT P	TTT F (SEQ ID NO: 96)

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las CDR1 de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) de los anticuerpos dirigidos contra ED-A con maduración de afinidad						
Anticuerpo	CDR1 (VH)			CDR1 (VL)		
B7	CAT H	TTT F	GAT D (SEQ ID NO: 103)	CTG L	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 106)
E8	GAT D	ATG M	CAT H (SEQ ID NO: 113)	TCG S	TCT S	TTT F (SEQ ID NO: 116)
G9	CAT H	ATG M	CAG Q (SEQ ID NO: 33)	ACT T	GCT A	TTT F (SEQ ID NO: 36)

Tabla 2

Datos de la evaluación por BIAcore			
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Anticuerpo dirigido contra ED-A original	$2,5 \times 10^5$	0,02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	$3,8 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2 \times 10^{-8}$
C5	$3,04 \times 10^5$	$9,23 \times 10^{-3}$	$\sim 3 \times 10^{-8}$
D5	$4,53 \times 10^5$	$7,6 \times 10^{-3}$	$\sim 1,7 \times 10^{-8}$
C8	$3,8 \times 10^5$	$5,3 \times 10^{-3}$	$\sim 1,4 \times 10^{-8}$
F8	$4,65 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$	$\sim 3,1 \times 10^{-9}$
B7	$2,67 \times 10^5$	$4,5 \times 10^{-3}$	$\sim 1,68 \times 10^{-8}$
G9	$3,6 \times 10^5$	$7,54 \times 10^{-3}$	$\sim 2,09 \times 10^{-8}$

5 LISTA DE SECUENCIAS

[0179]

- 10 < 110 > Philogen S.p.A. Neri, Dario Rybak, Jascha-Nikolai Villa, Alessandra Trachsel, Eveline
- < 120 > Un antígeno asociado con cánceres de pulmón y linfomas
- < 130 > SMWFP6557979
- 15 < 150 > US 60/951.765
- < 151 > 2007-07-25
- < 160 > 193
- 20 < 170 > PatentIn versión 3.3
- < 210 > 1
- < 211 > 118
- < 212 > PRT
- 25 < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
- 30 < 400 > 1

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 2

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo dirigido contra ED-A
H1

< 400 > 2

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 3

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

< 400 > 3

Pro Arg Arg

1

15

< 210 > 4

< 211 > 6

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

20

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

25

< 400 > 4

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

< 210 > 5
 < 211 > 6
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 5
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
 10 < 400 > 5

 Ser Thr His Leu Tyr Leu
 1 5

 < 210 > 6
 15 < 211 > 3
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

 < 220 >
 20 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

 < 400 > 6

 Ser Ala Trp
 25 1

 < 210 > 7
 < 211 > 7
 < 212 > PRT
 30 < 213 > Secuencia artificial

 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
 35 < 400 > 7

 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 40 < 210 > 8
 < 211 > 6
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

 < 220 >
 45 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

 < 400 > 8
 50

 Met Arg Gly Arg Pro Pro
 1 5

 < 210 > 9
 55 < 400 > 9
 000

ES 2 398 536 T3

< 210 > 10
 < 400 > 10
 000
 5
 < 210 > 11
 < 211 > 20
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 10
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de la secuencia conectora del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
 15
 < 400 > 11

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

 Gly Gly Gly Ser
 20
 20
 < 210 > 12
 < 211 > 354
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 25
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
 < 400 > 12

 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc ccgcggagga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300
 catttgtatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354
 30
 < 210 > 13
 < 211 > 387
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 35
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo dirigido contra ED-A H1
 40
 < 400 > 13

ES 2 398 536 T3

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc      300
caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat      360
ctgaatgggg ccgcatagac tgtgaaa                                           387

```

< 210 > 14
 < 211 > 60
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos de la secuencia conectora del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

< 400 >

ggcgggtggag gttctggcgg cgggtggcagt ggcgggtggag gttccggggg tggaggatct 60

< 210 > 15
 < 211 > 17
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 15

Phe	Leu	Thr	Thr	Thr	Pro	Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Ala	Pro
1				5					10					15	

Arg

< 210 > 16
 < 211 > 12
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 16

Ile	Ala	Trp	Glu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Arg
1				5					10		

< 210 > 17
 < 211 > 52
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado

< 220 >

< 221 > misc_feature
 < 222 > 27, 28, 30, 31, 33, 34
 < 223 > n e s a o g o c o t
 5 < 400 > 17
 ctggagcctg gcggaaccag ctcattmnnmn nmnngctaaa ggtgaatcca ga 52
 10 < 210 > 18
 < 211 > 58
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 15 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: cebador parcialmente degenerado
 20 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 < 222 > 28, 29, 31, 32, 34, 35
 < 223 > n e s a o g o c o t
 < 400 > 18
 ccaggtttct gctggtacca ggctaamnnm nmnngctaa cactctgact ggccctgc 58
 25 < 210 > 19
 < 211 > 26
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 30 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: cebador LMB3long
 35 < 400 > 19
 caggaaacag ctatgacat gattac 26
 40 < 210 > 20
 < 211 > 30
 < 212 > ADN
 < 213 > Secuencia artificial
 45 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: cebador fdseqlong
 < 400 > 20
 gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30
 50 < 210 > 21
 < 211 > 118
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 55 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A B2
 < 400 > 21

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala
 20 25 30
 Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

< 210 > 22

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B2

< 400 > 22

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 23

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A B2

< 400 > 23

Ala Ala Lys

1

15

< 210 > 24

< 400 > 24

000

20

< 210 > 25

< 400 > 25

000

25

< 210 > 26

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30

ES 2 398 536 T3

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A B2

5 < 400 > 26

Val Ala Phe
1

 $\langle 210 \rangle 27$

< 400 > 27
000

15 < 210 > 28
 < 211 > 5
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

20 < 220 >
< 223 > Secuencia sintética: secuencia conectora del fragmento bivalente F8
< 400 > 28

Gly Ser Ser Gly Gly
1 5

25

< 210 > 29
< 211 > 15
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial

< 220 >
< 223 > Secuencia sintética: secuencia conectora del fragmento bivalente F8

< 400 > 29

gggtccagtg gcggt 15

 $\langle 210 \rangle 30$

40 < 400 > 30
000

45 < 210 > 31
 < 211 > 118
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

50 < 220 >
< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A G9
< 400 > 31

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met
20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 32

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A G9

< 400 > 32

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 33

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A G9

< 400 > 33

His Met Gln

1

15

< 210 > 34

< 400 > 34

000

20

< 210 > 35

< 400 > 35

000

25

< 210 > 36

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

ES 2 398 536 T3

	< 220 >
	< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A G9
5	< 400 > 36
	Thr Ala Phe 1
10	< 210 > 37
	< 400 > 37 000
15	< 210 > 38
	< 400 > 38 000
20	< 210 > 39
	< 400 > 39 000
25	< 210 > 40
	< 400 > 40 000
30	< 210 > 41 < 211 > 118 < 212 > PRT < 213 > Secuencia artificial
35	< 220 > < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C5
	< 400 > 41

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 42

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C5

< 400 > 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

ES 2 398 536 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 43

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A C5

< 400 > 43

Pro Ile Thr
1

15

< 210 > 44

< 400 > 44
000

20

< 210 > 45

< 400 > 45
000

25

< 210 > 46

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A C5

35

< 400 > 46

Leu His Phe
1

40

< 210 > 47

< 400 > 47

000
 < 210 > 48
 5 < 400 > 48
 000
 < 210 > 49
 10 < 400 > 49
 000
 < 210 > 50
 15 < 400 > 50
 000
 < 210 > 51
 < 211 > 118
 20 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A D5
 25 < 400 > 51

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 398 536 T3

< 210 > 52
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

5

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A D5
 < 400 > 52

10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

< 210 > 53
 < 211 > 3
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

15

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A D5

20

< 400 > 53

Val Met Lys
 1

25

< 210 > 54

< 400 > 54
 000

ES 2 398 536 T3

< 210 > 55
 < 400 > 55
 5 000
 < 210 > 56
 < 211 > 3
 < 212 > PRT
 10 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A D5
 15 < 400 > 56
 Asn Ala Phe
 1
 20 < 210 > 57
 < 400 > 57
 000
 25 < 210 > 58
 < 400 > 58
 000
 30 < 210 > 59
 < 400 > 59
 000
 35 < 210 > 60
 < 400 > 60
 000
 40 < 210 > 61
 < 211 > 118
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 45 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E5
 < 400 > 61

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 62

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E5

< 400 > 62

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

ES 2 398 536 T3

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 63

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A E5

< 400 > 63

Thr Gly Ser

1

15

< 210 > 64

< 400 > 64

000

20

< 210 > 65

< 400 > 65

000

25

< 210 > 66

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A E5

< 400 > 66

Leu Ala His
1

5 < 210 > 67

< 400 > 67
000

10 < 210 > 68

< 400 > 68
000

15 < 210 > 69

< 400 > 69
000

20 < 210 > 70

< 400 > 70
000

25 < 210 > 71

< 211 > 118

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30 < 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C8

< 400 > 71

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

35

ES 2 398 536 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 72

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C8

< 400 > 72

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

15 < 210 > 73

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido
 5 contra ED-A C8

< 400 > 73

Leu Gln Thr
 1

10 < 210 > 74

< 400 > 74
 000

15 < 210 > 75

< 400 > 75
 000

20 < 210 > 76
 < 211 > 3
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

25 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido
 contra ED-A C8

30 < 400 > 76

Leu Pro Phe
 1

35 < 210 > 77

< 400 > 77
 000

40 < 210 > 78

< 400 > 78
 000

45 < 210 > 79

< 400 > 79
 000

50 < 210 > 80

< 400 > 80
 000

55 < 210 > 81
 < 211 > 118
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

60

ES 2 398 536 T3

< 400 > 81

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Phe	20	25	30	
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Ser	Thr	His	Leu	Tyr	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											115			

5

< 210 > 82
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

10

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

15

< 400 > 82

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 83

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

< 400 > 83

Leu Phe Thr

1

15

< 210 > 84

< 400 > 84
000

20

< 210 > 85

< 400 > 85
000

25

< 210 > 86

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30

ES 2 398 536 T3

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

5 < 400 > 86

Met Pro Phe
1

10 < 210 > 87

< 400 > 87
000

15 < 210 > 88

< 400 > 88
000

20 < 210 > 89

< 400 > 89
000

25 < 210 > 90

< 400 > 90
000

30 < 210 > 91

< 211 > 118

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

35 < 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

< 400 > 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
20 25 30

40

ES 2 398 536 T3

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 92

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

< 400 > 92

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

ES 2 398 536 T3

85

90

95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 93

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

< 400 > 93

Gln Ala Arg
1

15

< 210 > 94

< 400 > 94
000

20

< 210 > 95

< 400 > 95
000

25

< 210 > 96

< 211 > 3

< 212 > PRT

30 < 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

35

< 400 > 96

Ala Pro Phe
1

40

< 210 > 97

< 400 > 97
000

45

< 210 > 98

< 400 > 98
000

50

< 210 > 99

ES 2 398 536 T3

< 400 > 99
 000
 < 210 > 100
 5 < 400 > 100
 000
 < 210 > 101
 10 < 211 > 118
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 15 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A B7
 < 400 > 101

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
 20 25 30

 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 20 < 210 > 102
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial
 25 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B7
 < 400 > 102
 30

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 103

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A B7

< 400 > 103

His Phe Asp

1

15

< 210 > 104

< 400 > 104
000

20

< 210 > 105

< 400 > 105
000

25

< 210 > 106

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

ES 2 398 536 T3

	< 220 >
	< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A B7
5	< 400 > 106
	Leu Ala Phe 1
10	< 210 > 107
	< 400 > 107 000
15	< 210 > 108
	< 400 > 108 000
20	< 210 > 109
	< 400 > 109 000
25	< 210 > 110
	< 400 > 110 000
30	< 210 > 111
	< 211 > 118
	< 212 > PRT
	< 213 > Secuencia artificial
35	< 220 >
	< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E8
	< 400 > 111

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 112

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos del dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E8

< 400 > 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 398 536 T3

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 113

< 211 > 3

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra ED-A E8

< 400 > 113

Asp Met His
1

15

< 210 > 114

< 400 > 114
000

20

< 210 > 115

< 400 > 115
000

25

< 210 > 116

< 211 > 3

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

30

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra ED-A E8

35

< 400 > 116

Ser Ser Phe
1

40

< 210 > 117

< 211 > 350

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 117

45

ES 2 398 536 T3

Asn	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Lys	Thr	Lys	Thr	Ala	Ser	Pro	Asp	Gln	Thr	1	5	10	15
Glu	Met	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	20	25	30	
Val	Tyr	Ala	Gln	Asn	Arg	Asn	Gly	Glu	Ser	Gln	Pro	Leu	Val	Gln	Thr	35	40	45	
Ala	Val	Thr	Asn	Ile	Asp	Arg	Pro	Lys	Gly	Leu	Ala	Phe	Thr	Asp	Val	50	55	60	
Asp	Val	Asp	Ser	Ile	Lys	Ile	Ala	Trp	Glu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gln	Val	65	70	75	80
Ser	Arg	Tyr	Arg	Val	Thr	Tyr	Ser	Ser	Pro	Glu	Asp	Gly	Ile	Arg	Glu	85	90	95	
Leu	Phe	Pro	Ala	Pro	Asp	Gly	Glu	Asp	Asp	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	100	105	110	
Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Val	Val	Ala	Leu	His	Asp	115	120	125	
Asp	Met	Glu	Ser	Gln	Pro	Leu	Ile	Gly	Ile	Gln	Ser	Thr	Ala	Ile	Pro	130	135	140	
Ala	Pro	Thr	Asn	Leu	Lys	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Phe	Thr	145	150	155	160
Ala	Gln	Trp	Ile	Ala	Pro	Ser	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	165	170	175	
Val	Asn	Pro	Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ser	180	185	190	
Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Val	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Ala	Thr	Lys				

ES 2 398 536 T3

195	200	205
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro		
210	215	220
Ala Gln Gly Val Ile Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
225	230	235
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg		
245	250	255
Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala		
260	265	270
Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg Ser Ile Ser Pro Asp Val Arg Ser		
275	280	285
Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile His Leu		
290	295	300
Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala		
305	310	315
Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Thr Thr Thr		
325	330	335
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro Arg Ala Arg		
340	345	350

< 210 > 118
 < 211 > 90
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 118

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
1 5 10 15
Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
20 25 30
Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
35 40 45

ES 2 398 536 T3

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr
85 90

< 210 > 119
< 211 > 90
< 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

< 400 > 119

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp
1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro
35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu
65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr
85 90

< 210 > 120
< 211 > 288
< 212 > PRT
< 213 > Secuencia artificial

< 220 >
< 223 > Secuencia sintética: antígeno (11A12) que contiene el dominio ED-A de fibronectina humana

< 400 > 120

Met Arg Ser Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val
1 5 10 15

ES 2 398 536 T3

Thr	Asp	Val	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Trp	Leu	Pro	Ser	Ser	20	25	30
Ser	Pro	Val	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Thr	Thr	Thr	Pro	Lys	Asn	Gly	Pro	35	40	45
Gly	Pro	Thr	Lys	Thr	Lys	Thr	Ala	Gly	Pro	Asp	Gln	Thr	Glu	Met	Thr	50	55	60
Ile	Glu	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	65	70	75
Gln	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Ser	Gln	Pro	Leu	Val	Gln	Thr	Ala	Val	Thr	85	90	95
Asn	Ile	Asp	Arg	Pro	Lys	Gly	Leu	Ala	Phe	Thr	Asp	Val	Asp	Val	Asp	100	105	110
Ser	Ile	Lys	Ile	Ala	Trp	Glu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Arg	Tyr	115	120	125
Arg	Val	Thr	Tyr	Ser	Ser	Pro	Glu	Asp	Gly	Ile	His	Glu	Leu	Phe	Pro	130	135	140
Ala	Pro	Asp	Gly	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu	Arg	Pro	145	150	155
Gly	Ser	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Val	Val	Ala	Leu	His	Asp	Asp	Met	Glu	165	170	175
Ser	Gln	Pro	Leu	Ile	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Ala	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	180	185	190
Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gln	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Trp	195	200	205
Thr	Pro	Pro	Asn	Val	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Pro	210	215	220
Lys	Glu	Lys	Thr	Gly	Pro	Met	Lys	Glu	Ile	Asn	Leu	Ala	Pro	Asp	Ser	225	230	235
																		240

ES 2 398 536 T3

Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
245 250 255

Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
260 265 270

Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Arg Ser His His His His His His
275 280 285

< 210 > 121
< 211 > 867
< 212 > ADN
< 213 > Secuencia artificial

< 220 >
< 223 > Secuencia sintética: secuencia de nucleótidos del antígeno (11A12)
< 400 > 121

```

atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgac cgatgttcag      60
gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta      120
accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa      180
acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtgggttag tgtctatgct      240
cagaatccaa gcgagagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc      300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc      360
ccacaggggc aagtttccag gtacaggggtg acctactcga gccctgagga tggaatccat      420
gagctattcc ctgcacctga tgggtgaagaa gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg      480
ggttctgagt acacagtcag tgtgggtgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccctg      540
attggaaccc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca      600
cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcactgg atatcgagtg      660
cgggtgaccc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tcctgacagc      720
tcatccgtgg ttgtatcagg acttatgggtg gccaccaa atgaagtgag tgtctatgct      780
cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgtc      840
agatctcatc accatcacca tcaactaa                                     867

```

< 210 > 122
< 211 > 10
< 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

< 400 > 122

ES 2 398 536 T3

His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg
1 5 10

5 < 210 > 123
 < 211 > 9
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

 < 400 > 123

10 Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys
1 5

15 < 210 > 124
 < 211 > 17
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 124

His Ala Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr Asp Val
1 5 10 15

	Arg
20	< 210 > 125 < 211 > 7 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus
25	< 400 > 125

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys
1 5

30 < 210 > 126
 < 211 > 11
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

35 < 400 > 126

Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu Lys
1 5 10

40 < 210 > 127
 < 211 > 16
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 127

Trp Lys Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10 15

50 < 210 > 128
 < 211 > 14
 < 212 > PRT

ES 2 398 536 T3

< 213 > Mus musculus

< 400 > 128

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys
1 5 10

< 210 > 129

 $\langle 211 \rangle 21$

< 212 > PRT

10 < 213 > Mus musculus

< 400 > 129

Gly Leu Thr Pro Gly Val Ile Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln
1 5 10 15

Gln Tyr Gly His Arg
20

15

< 210 > 130

 $\langle 211 \rangle = 12$

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

20

< 400 > 130

Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg
1 5 10

25

< 210 > 131

< 211 > 19

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

30

< 400 > 131

Ser Asp Asn Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Gln Phe Val Glu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Val Lys

35

< 210 > 132

 $\langle 211 \rangle$ 16

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 132

40

Val	Thr	Ile	Met	Trp	Thr	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Ser	Gly	Tyr	Arg
1				5					10					15	

< 210 > 133

 $\langle 211 \rangle 15$

45 < 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 133

ES 2 398 536 T3

	Val	Glu	Val	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Pro	Gly	Glu	His	Gly	Gln	Arg					
	1				5					10					15					
5	< 210 > 134 < 211 > 18 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus																			
10	< 400 > 134																			
	Asn	Thr	Phe	Ala	Glu	Ile	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Val	Thr	Tyr	Leu				
	1				5					10					15					
	Phe Lys																			
15	< 210 > 135 < 211 > 8 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus																			
	< 400 > 135																			
20					Val	Phe	Ala	Val	His	Gln	Gly	Arg								
					1				5											
25	< 210 > 136 < 211 > 10 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus																			
	< 400 > 136																			
30					Thr	Val	Leu	Val	Thr	Trp	Thr	Pro	Pro	Arg						
					1				5					10						
35	< 210 > 137 < 211 > 10 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus																			
	< 400 > 137																			
40					Gln	Tyr	Asn	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Ser	Lys						
					1				5					10						
45	< 210 > 138 < 211 > 16 < 212 > PRT < 213 > Mus musculus																			
	< 400 > 138																			
50					Asn	Leu	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Val	Ala	Val	Lys
					1				5					10				15		
	< 210 > 139 < 211 > 12																			

ES 2 398 536 T3

< 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 139
 5
 Ala Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro Leu Arg
 1 5 10
 < 210 > 140
 < 211 > 13
 10 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 140
 Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg
 1 5 10
 15
 < 210 > 141
 < 211 > 28
 < 212 > PRT
 20 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 141
 Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn
 1 5 10 15
 Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg
 20 25
 25
 < 210 > 142
 < 211 > 10
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 30
 < 400 > 142
 Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10
 35
 < 210 > 143
 < 211 > 17
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 40
 < 400 > 143
 Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Glu Leu Thr Asn Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Arg
 45
 < 210 > 144
 < 211 > 27
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

ES 2 398 536 T3

< 400 > 144

Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Phe Asp Ser Ser Asp Ile Thr Ala
1 5 10 15

Asn Ser Phe Thr Val His Trp Val Ala Pro Arg
20 25

5

< 210 > 145

< 211 > 9

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

10

< 400 > 145

Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg

1

5

15

< 210 > 146

< 211 > 11

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

20

< 400 > 146

His His Ala Glu His Ser Val Gly Arg Pro Arg
1 5 10

25

< 210 > 147

< 211 > 18

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 147

30

Glu Glu Ser Pro Pro Leu Ile Gly Gln Gln Ala Thr Val Ser Asp Ile
1 5 10 15

Pro Arg

35

< 210 > 148

< 211 > 21

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 148

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr
1 5 10 15

40

Val Pro Gly Ser Lys
20

ES 2 398 536 T3

< 210 > 149
 < 211 > 12
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 5
 < 400 > 149

 Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
 1 5 10

 10
 < 210 > 150
 < 211 > 24
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

 15
 < 400 > 150

 Ser Thr Ala Thr Ile Asn Asn Ile Lys Pro Gly Ala Asp Tyr Thr Ile
 1 5 10 15

 Thr Leu Tyr Ala Val Thr Gly Arg
 20

 20
 < 210 > 151
 < 211 > 15
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

 < 400 > 151
 25
 Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val Ser Ile Asn Tyr Lys
 1 5 10 15

 30
 < 210 > 152
 < 211 > 22
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

 < 400 > 152

 Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp
 1 5 10 15

 Asn Ser Ile Ser Val Arg
 20
 35

 < 210 > 153
 < 211 > 12
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus
 40

 < 400 > 153

 Trp Leu Pro Ser Thr Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg
 1 5 10
 45
 < 210 > 154

ES 2 398 536 T3

< 211 > 29
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

5 < 400 > 154

Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Arg
 20 25

10 < 210 > 155
 < 211 > 22
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

15 < 400 > 155

Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Thr Ile Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Asn Leu Lys
 20

20 < 210 > 156
 < 211 > 19
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 156

Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp
 1 5 10 15

25 Arg Pro Lys

30 < 210 > 157
 < 211 > 12
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 157

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
 1 5 10

35 < 210 > 158
 < 211 > 11
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

40 < 400 > 158

ES 2 398 536 T3

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg

1 5 10

< 210 > 159
< 211 > 24
5 < 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

< 400 > 159

Phe Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr Ala Gln Trp Ile Ala Pro
1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg
20

10

15 < 210 > 160
< 211 > 9
< 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

< 400 > 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
1 5

20
25 < 210 > 161
< 211 > 24
< 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

< 400 > 161

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala
1 5 10 15

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

30 < 210 > 162
< 211 > 22
< 212 > PRT
< 213 > Mus musculus

35 < 400 > 162

Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala Asn Gly
1 5 10 15

Gln Thr Pro Val Gln Arg
20

< 210 > 163

ES 2 398 536 T3

< 211 > 14
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

5 < 400 > 163

Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
 1 5 10

10 < 210 > 164
 < 211 > 11
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

15 < 400 > 164

Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg
 1 5 10

20 < 210 > 165
 < 211 > 19
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 165

Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser
 1 5 10 15

25 Asn Leu Arg

30 < 210 > 166
 < 211 > 17
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

< 400 > 166

Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro
 1 5 10 15

Arg

35 < 210 > 167
 < 211 > 7
 < 212 > PRT
 < 213 > Mus musculus

40 < 400 > 167

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys
 1 5

45 < 210 > 168
 < 211 > 9
 < 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

< 400 > 168

5 Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg
1 5

< 210 > 169

< 211 > 17

< 212 > PRT

10 < 213 > Mus musculus

< 400 > 169

Pro Tyr Leu Pro Asn Val Asp Glu Glu Val Gln Ile Gly His Val Pro
1 5 10 15

Arg

15

< 210 > 170

< 211 > 15

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

20

< 400 > 170

Gly Val Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Gln Asn Gln Arg
1 5 10 15

25

< 210 > 171

< 211 > 23

< 212 > PRT

< 213 > Mus musculus

30

< 400 > 171

Arg Pro Gly Ala Ala Glu Pro Ser Pro Asp Gly Thr Thr Gly His Thr
1 5 10 15

Tyr Asn Gln Tyr Thr Gln Arg

20

35 < 210 > 172

< 211 > 118

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

40 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

< 400 > 172

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 173

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A B2

10

< 400 > 173

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala
 20 25 30
 Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

< 210 > 174

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C5

< 400 > 174

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

< 210 > 175

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A D5

< 400 > 175

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 176

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E5

< 400 > 176

ES 2 398 536 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 177

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A C8

< 400 > 177

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln

ES 2 398 536 T3

[illegible]

< 210 > 178

< 211 > 118

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

< 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

< 400 > 178

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ES 2 398 536 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 179

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

< 400 > 179

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Ala
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 < 210 > 180

< 211 > 118

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

20 < 220 >

< 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A B7

ES 2 398 536 T3

< 400 > 180

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Phe
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

< 210 > 181
< 211 > 118
< 212 > PRT
< 213 > Secuencia artificial

10

< 220 >
< 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A E8

< 400 > 181

15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Met
20 25 30

ES 2 398 536 T3

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 182

< 211 > 118

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VH del anticuerpo dirigido contra ED-A G9

< 400 > 182

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met
20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 398 536 T3

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

< 210 > 183

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A H1

< 400 > 183

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

15 < 210 > 184

< 211 > 125

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

20 < 220 >

< 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B2

< 400 > 184

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 185

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C5

< 400 > 185

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

ES 2 398 536 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 186

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A D5

< 400 > 186

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

ES 2 398 536 T3

< 210 > 187
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 5 < 213 > Secuencia artificial

 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E5
 10 < 400 > 187

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30

 His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

 15 < 210 > 188
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

 < 220 >
 20 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A C8

 < 400 > 188

ES 2 398 536 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 189

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F8

< 400 > 189

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ES 2 398 536 T3

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 190

< 211 > 125

< 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

< 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A F1

< 400 > 190

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115

120

125

< 210 > 191

ES 2 398 536 T3

< 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

5 < 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A B7
 < 400 > 191

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
 100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
 115 120 125

10

< 210 > 192
 < 211 > 125
 < 212 > PRT
 < 213 > Secuencia artificial

15

< 220 >
 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A E8

20

< 400 > 192

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

ES 2 398 536 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

< 210 > 193

< 211 > 125

5 < 212 > PRT

< 213 > Secuencia artificial

< 220 >

10 < 223 > Secuencia sintética: dominio VL del anticuerpo dirigido contra ED-A G9

< 400 > 193

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

ES 2 398 536 T3

65					70					75				80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Met	Arg	Gly	Arg
				85					90				95	Pro
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala
			100					105					110	Glu
Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala		
		115					120					125		

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a la isoforma extradominio A (ED-A) de fibronectina para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer de pulmón, en el que el anticuerpo se conjuga con una molécula que tiene actividad biocida o citotóxica, o a un radioisótopo.
2. Un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina para su uso en un procedimiento in vivo de diagnóstico del cáncer de pulmón en un ser humano o animal.
3. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el anticuerpo se une al ED-A de fibronectina.
4. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el procedimiento de diagnóstico de cáncer de pulmón comprende las etapas de:
 - (a) administrar al ser humano o al animal el anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina, y
 - (b) determinar la presencia o ausencia del anticuerpo en el pulmón del cuerpo humano o animal;
 en el que la localización del anticuerpo en el pulmón indica la presencia del cáncer de pulmón.
5. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH y un dominio VL, y en el que el dominio VH comprende una región armazón y un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y el dominio VL comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región armazón, y
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 36, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 53, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 56, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 63, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 66, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 73, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 76, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o
 - en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 83, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de

aminoácidos SEQ ID NO: 86, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o

5 en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 93, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 96, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o

10 en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 103, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 106, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; o

15 en el que HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 113, HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 y HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 116, LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, y LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

20 6. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región armazón del dominio VH es una región armazón de línea germinal humana.

7. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6,

25 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2; o

en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; o

30 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32; o

en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42; o

35 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52; o

40 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 61 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 62; o

en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 72; o

45 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82; o

en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 91 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 92; o

50 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 101 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 102; o

55 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 111 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 112.

8. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el anticuerpo es un Fv de una cadena, o un fragmento bivalente.

60 9. El uso de un anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina conjugado con una molécula para la preparación de un medicamento para suministrar a un tumor pulmonar la molécula conjugada con el anticuerpo, en el que la molécula tiene actividad biocida o citotóxica, o es un radioisótopo.

10. El uso de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo se une al ED-A de fibronectina.

- en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; o
- 5 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 31 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32; o
- en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42; o
- 10 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52; o
- en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 61 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 62; o
- 15 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 72; o
- 20 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 81 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 82; o
- en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 91 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 92; o
- 25 en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 101 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 102; o
- en el que el dominio VH tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 111 y el dominio VL tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 112.
- 30 13. Un procedimiento in vitro de diagnóstico del cáncer de pulmón, en el que se usa el anticuerpo que se une a la isoforma ED-A de fibronectina.

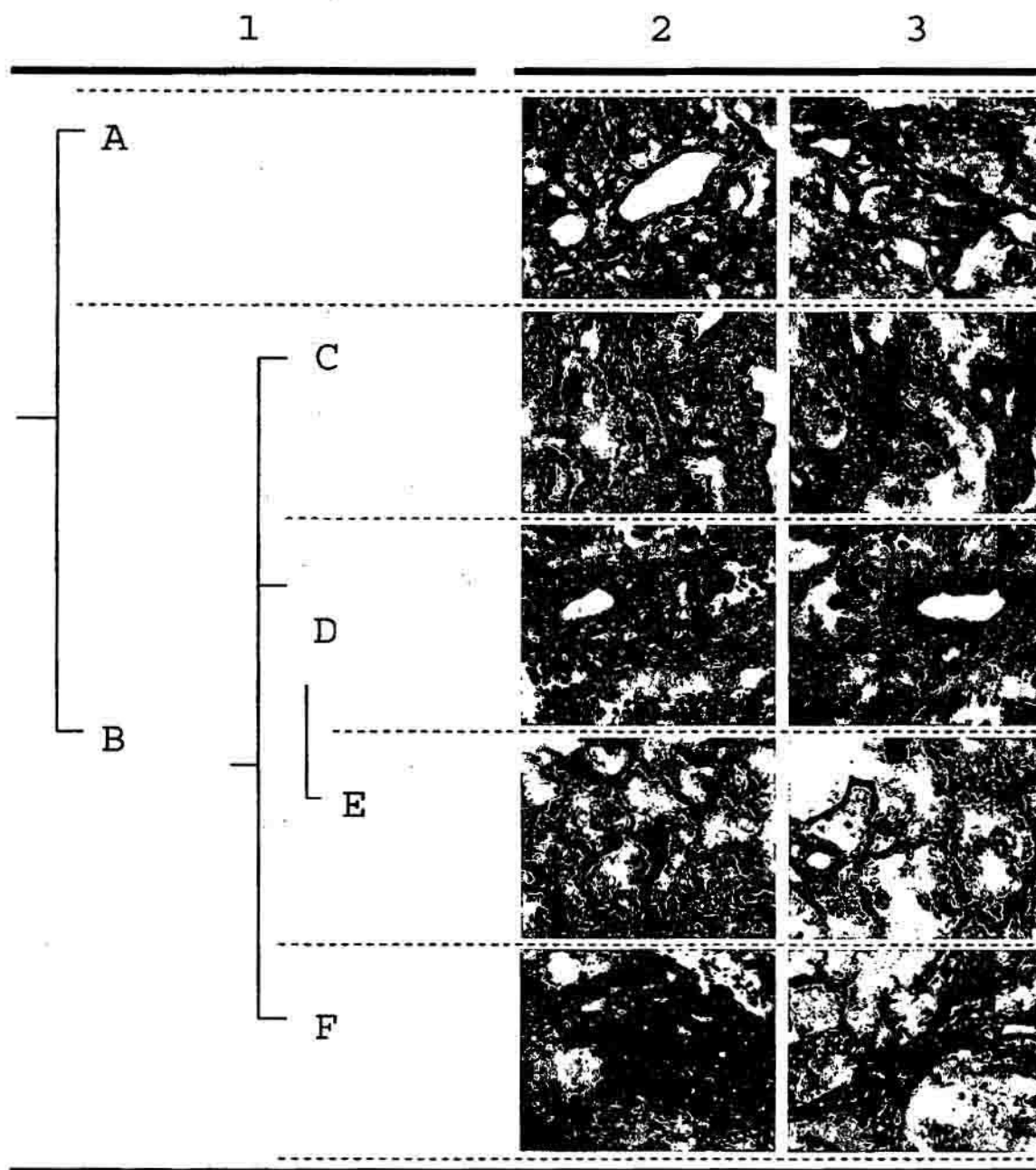


Figura 1

```

A 1 NIDRPKGLAFTDQVDSIKIAWESQGVSRVRYTYSSPEDGIRHLPAPDGEDDTAELQ
   *****
B 1 NIDRPKGLAFTDQVDSIKIAWESQGVSRVRYTYSSPEDGIRHLPAPDGEDDTAELQ
   *****

A 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
   *****
B 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
   *****

```

Figura 2

A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTT
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

Figura 3

C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTTCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

continuación Figura 3

A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS
S

B

GGGGS
GGGGS
GGGGS
GGGGS
GGGGS

C

EIVLTQSPGTLSSLSPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS
EEDLNGAA

Figura 4